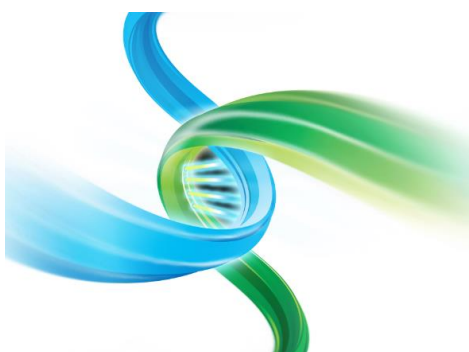
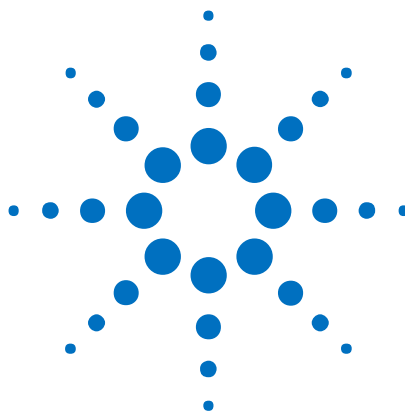




アジレント **SureSelect^{XT}** (ポストプール) ターゲットエンリッチメントシステム

イルミナペアエンドマルチプレックス
シーケンス
HiSeq/MiSeq 対応キット

オンビーズ PCR 法対応

和文プロトコル

Protocol Version B.5 対応

[2017 年 1 月版 和文]

アジレントシュアプリントテクノロジーで製造した

SureSelect プラットフォーム

Research Use Only.

Not for use in Diagnostic Procedures.

本プロトコルについて

プロトコルは予告なく変更になることがあります。プロトコルを日本語化するにあたり、作業時間が発生するため、日本語プロトコルは英語の最新バージョンに比べて、どうしても遅れが生じます。製品ご購入の際は、必ず英語版プロトコルの Version をお確かめの上、日本語版が古い場合は、使用プロトコルについて、弊社までお問い合わせいただきますようお願い申し上げます。

本日本語プロトコルは、英語版の
Protocol
SureSelect^{XT} Target Enrichment System
for Illumina Multiplexed Sequencing
Version B.5, June 2016
G7530-90000

に対応していますが、一部日本の冬季の室温にあわせて改訂しています。本バージョンについての英文、和文の記載の違いについては、和文プロトコルを参照ください。

このプロトコルでは、イルミナペアエンドマルチプレックスシーケンスに対応したアジレント SureSelect^{XT} Target Enrichment System のサンプル調製キットを用い、ゲノムの中のターゲット領域を Capture するための操作手順を記述しています。本プロトコルは、ビオチン化 RNA オリゴマーライブラリ (Bait) を使って、ターゲットとするゲノム DNA の領域を、リピート配列やターゲット領域以外のシーケンスを除いて濃縮するために開発、最適化されています。サンプルは個別にキャプチャを行い、キャプチャ後にインデックスを付けてプールのポストプール対応のプロトコルです。

このプロトコルは、イルミナ社マルチプレックスペアエンドシーケンス対応用の SureSelect^{XT} キットを用いて、ライブラリを調製するためのものです。プレプール、シングルエンド、マルチプレックスではないペアエンド、メイトペアシーケンス、その他のライブラリには対応していませんので、ご注意ください。

本プロトコルに関するご質問やご意見などございましたら、下記のメールアドレスにご連絡ください。

email_japan@agilent.com

1. はじめに

この章では、実験をはじめる前に読む必要がある情報(安全上の注意点、必要な試薬や機器など)について説明しています。必ず実験前にお読みください。

2. サンプルの調製 (3ug DNA サンプル)

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

これらの章では、ターゲット領域の濃縮に用いる DNA サンプルの調製法について説明しています。

4. ハイブリダイゼーション

この章では、サンプルの調製とハイブリダイゼーションのステップについて説明しています。3 ug DNA サンプル、200 ng DNA サンプルのどちらも、ハイブリダイゼーション以降の操作ステップは同一です。

5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

この章では、ハイブリダイゼーション後のサンプルの増幅、精製と品質チェックのステップについて説明しています。

6. Appendix : FFPE 由来 DNA サンプルの使用

この章では、FFPE 由来 DNA サンプルに対する推奨のプロトコル改変について説明しています。

7. リファレンス

この章では、本実験に用いる装置や消耗品の付加的な注意点について説明しています。

これまでのバージョンでの変更点

Ver.B.3., B.4. B.5 での変更点

- ・ FFPE 由来 DNA サンプルを使用する際のプロトコル改変を追記しました。Low Input ライブラリ調製プロトコル「3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)」を使用する際は、「6. Appendix : FFPE 由来 DNA サンプルの使用」を参照して下さい。
- ・ Human All Exon V6、OneSeq 1Mb CNV backbone キャプチャライブラリを追加しました。
- ・ 96 ウェルプレートおよび 8 連チューブの容量についての注意点を追加しました。(10 ページ、14 ページ、20 ページ)
- ・ 200 ng プロトコルにおけるコバリスでの DNA 断片化について、補足説明を追加しました。
- ・ NextSeq プラットフォームでのシーケンスについてなど、シーケンシングガイドラインを追記しました。(85 ページ)
- ・ 実験の所要時間を変更しました。

Ver.B.2 での変更点

- ・ OneSeq キャプチャライブラリを追加しました。
- ・ ClearSeq Comprehensive Cancer XT ライブラリなどの ClearSeq キャプチャライブラリを追加しました。

Ver.B.1 での変更点

- ・ 2014 年 12 月の初旬から、従来の 6 bp のインデックスに変わり、新しい 8 bp のインデックスが添付されるようになりました。6 bp、8 bp の長さにより、使用するインデックスの液量が異なるため、それぞれのインデックスを使用する際のプロトコルを記載しました。使用する長さのインデックスのプロトコルを必ずご参照ください。
- ・ 8 bp のインデックスは、16 反応用は白いキャップのチューブ(従来の 6 bp は透明キャップのチューブ)、96 反応用は、青い 96 well plate(従来の 6 bp は、透明キャップのチューブ)に入っています。インデックス試薬の詳細および 8 bp のインデックスの配列については、プロトコル末尾のリファレンスを参照ください。
- ・ 従来品の 6 bp のインデックス試薬は、16 反応用、96 反応用ともに透明キャップのチューブに入っています。使用するインデックス試薬を事前によく確認のうえ、適切なプロトコルをご使用ください。
- ・ これまで 1.5 mL のチューブの使用を前提としていたプロトコルが、サーマルサイクラに対応した 8 Strip tubes もしくは 96 well plate の使用に変更されました。それに伴い、エタノール Wash やキャプチャ後の Wash などのステップでの液量も変更されました。
- ・ ハイブリダイゼーションのステップで使用する試薬量に変更されました。ただし、この変更は、ハイブリダイゼーション溶液の最終的な組成には影響しません。
- ・ Version1.4.1 で変更されたキャプチャ後の増幅ステップでの On-bead PCR の採用により不要となっていた Elution Buffer と Neutralization Buffer が、ハイブリダイゼーションキットに含まれなくなりました。詳細はリファレンスの項を参照ください。

目次

1. はじめに 7

- 操作に関する注意 10
- 安全に関する注意 10
- 実験に必要な試薬 11
- 実験に必要な装置、消耗品類 14

2. サンプルの調製 (3ug DNA サンプル) 16

- STEP1. DNA の断片化 18
- STEP2. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 20
- STEP3. 電気泳動による品質(サイズ)チェック 22
- STEP4. 末端修復 24
- STEP5. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 25
- STEP6. DNA 断片の 3'end に A オーバーハング付加 27
- STEP7. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 28
- STEP8. インデックス用アダプターライゲーション 29
- STEP9. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 30
- STEP10. アダプター付き DNA ライブラリの増幅 31
- STEP11. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 34
- STEP12. 電気泳動による DNA サンプルのサイズチェックと定量 35

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル) 37

- STEP1. DNA の断片化 39
- STEP2. 電気泳動による品質(サイズ)チェック 41
- STEP3. 末端修復 42
- STEP4. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 44
- STEP5. DNA 断片の 3'end に A オーバーハング付加 46
- STEP6. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 47
- STEP7. インデックス用アダプターライゲーション 48
- STEP8. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 50
- STEP9. アダプター付き DNA ライブラリの増幅 51
- STEP10. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 54
- STEP11. 電気泳動による DNA サンプルのサイズチェックと定量 55

4. ハイブリダイゼーション 58

- STEP1. ライブラリのハイブリダイゼーション 60
- STEP2. 磁気ビーズの調製 66
- STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収 67

5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加 69

- STEP1A. 8 bp インデックスバーコードタグ (A01-H12) を用いたキャプチャ後ライブラリの増幅 70
- STEP1B. 6 bp インデックスバーコードタグ (Index 1-16) を用いたキャプチャ後ライブラリの増幅 75

- STEP2. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製 78
- STEP3. Agilent 2100 バイオアナライザによるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認 79
- STEP4. 定量 PCR によるインデックスタグ付きキャプチャライブラリの定量 82
- STEP5. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール 83
- STEP6. シーケンスサンプルの準備 85

6. Appendix : FFPE 由来 DNA サンプルの使用 87

- 全ての FFPE 由来 DNA サンプルに適用可能な改変 88
- Agilent NGS FFPE QC キットによる測定結果を用いたプロトコル改変 89
- TapeStation の Genomic DNA キットによる測定結果を用いたプロトコル改変 90

7. リファレンス 92

- 試薬一覧 8 bp のインデックスが入った試薬キット 93
- 試薬一覧 6 bp のインデックスが入った試薬キット 97
- キャプチャハイブリダイゼーションに使用する機器とチューブ類の組み合わせについて 100

1. はじめに

最新のプロトコルを参照してください。

実験をはじめる前に、必要な機器と試薬について必ずご確認ください。

NOTE

Target Enrichment Kit を本プロトコルに記載されている以外の non-Agilent プロトコルを用いて使用する場合、キットは保証の対象外となり、技術サポートも適用外となります点、ご了承ください。SureSelect キャプチャライブラリとその試薬は納品後 1 年以内にご使用頂きますようお願いいたします。

NOTE

本プロトコルは、イルミナ社のマルチプレックスペアエンドサイブラリ作製プロトコルと異なる点がありますのでご注意ください。

NOTE

使用するインデックスの長さ(8 bp もしくは 6 bp)により、プロトコルが異なります。必ず事前にご使用になるインデックスの長さを確認の上、適切なプロトコルをご使用ください。

NOTE

本プロトコルは、アジレント社の SureSelect^{XT} キットを用いて、イルミナ用のマルチプレックスペアエンドライブラリを作製します。各増幅ステップで使用する Primer と、ハイブリダイゼーションで用いる Blocking Agent の種類を間違えないようにご注意ください。

NOTE

ベックマン・コールター社製の精製ビーズについては、必ずベックマン・コールター社のユーザーズガイドをあわせて参照ください。

NOTE

本プロトコルでの室温は、20～25 °C の範囲となります。できるだけこの範囲内の室温で操作してください。特に 20 °C 未満での低温での操作はハイブリダイゼーションバッファの析出を招き、結果に悪影響を与える危険性があります。

1. はじめに
操作の概要

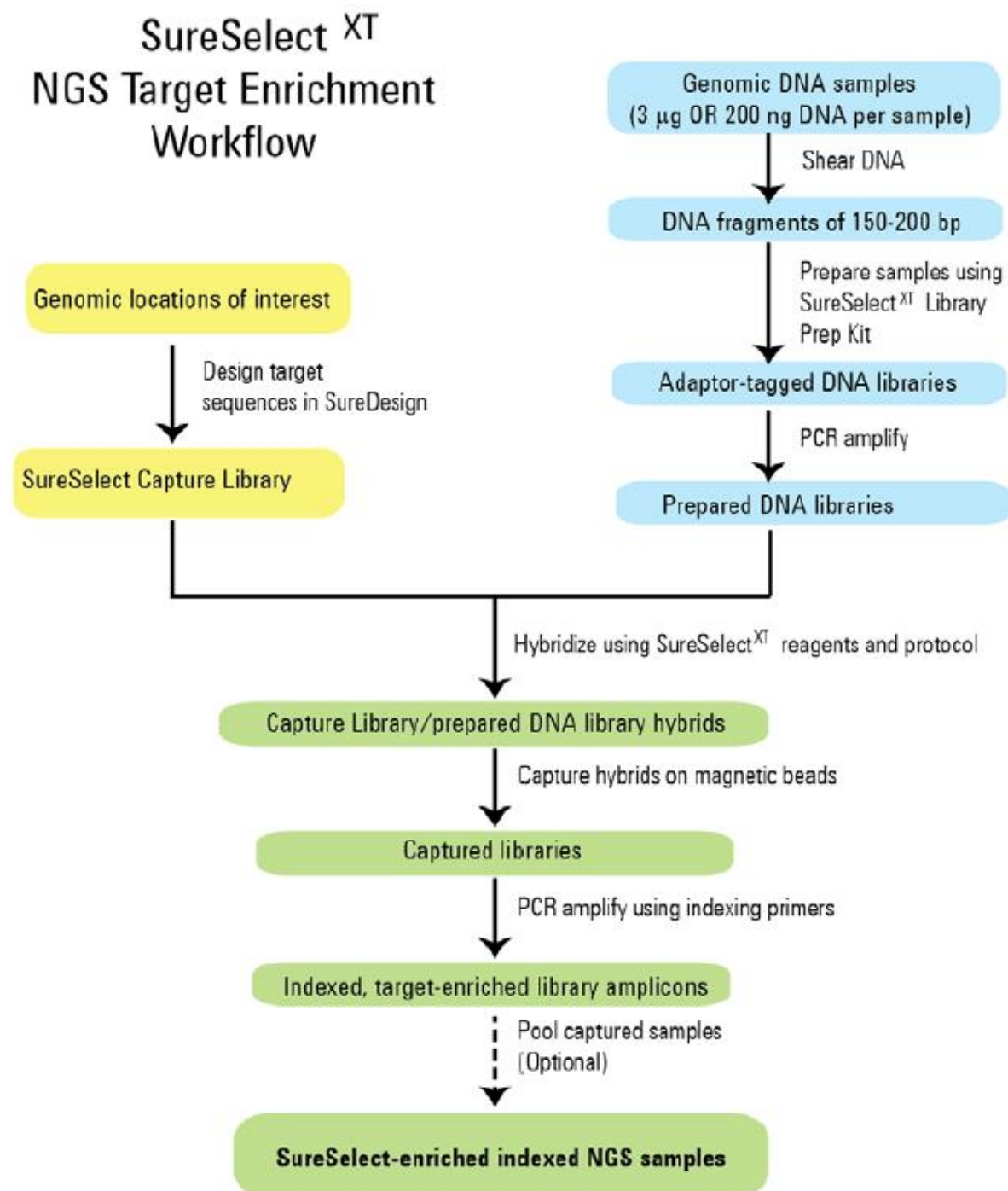


図 1 サンプル調製ワークフロー

表 1 実験の所要時間 概略

ステップ	時間
ライブラリ調製	5 時間
ライブラリハイブリダイゼーション	16 時間または 24 時間(最大 72 時間)
ハイブリダイゼーション後の増幅	1 時間
バイオアナライザ/TapeStation による QC とサンプルのプール	1.5 時間

1. はじめに

操作に関する注意

- このプロトコルは表 4 実験に必要な装置、消耗品類に記載のプレートまたはチューブでのサンプル処理を想定しています。プロトコルの中には扱う液量が 0.2 mL を超えるステップがありますが、推奨のプレートまたはチューブではこの量を処理することが可能です。他のプレートまたはチューブを使用する場合は、実験を始める前に 3 µg プロトコルでは少なくとも 0.31 mL の液量が入ることを、200 ng プロトコルでは少なくとも 0.28 mL の液量が入ることを確認して下さい。扱う液量が多いステップでは、サンプルを 1.5 mL チューブに移して処理をすることもできますが、スループットと収量に影響がある可能性があります。
- ヌクレアーゼの試薬への混入を避けるために、操作を行う場合は、必ずパウダーフリーのラボ用手袋を着用し、適切な溶液、ピペット、ヌクレアーゼフリー エアロゾル防止フィルタ付きピペットチップを使用ください。
- 実験スペースは常にクリーンな状態にします。
- gDNA を含む溶液は、Vortex で混合しないようにしてください。指でそっとタッピングすることで、液を混合するようにしてください。
- gDNA を含む溶液は、できるだけ凍結融解の繰り返しを避けるようにしてください。
- 凍結しているストック溶液を使用する際には次のステップで行います。
 - 室温以上の温度で加熱しないように、かつできるだけ速く分注された溶液を融かします。
 - Vortex Mixer で軽く短時間混ぜ、遠心機で 5～10 秒遠心して、チューブの壁やふたについた液を落とします。
 - 使用時までオンアイスまたは冷却ブロックの中で保存します。
- 各ステップでは、PCR プレートもしくは 8 strip tube の Cap Strip をステップごとに外す必要があります。再びキャップをするときには、常に新しい Cap Strip を使用することを推奨します。一度使用した Cap Strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。
- Biosafety Level 1 (BL1) のルールに基づき、実験を行います。

安全に関する注意

CAUTION

実験室で実験を行う際は、各実験室において決められた規則に従い、保護用の用具（白衣、安全眼鏡など）を着用してください。

実験に必要な試薬

下記の表は以下のウェブサイトから pdf ファイルをダウンロードすることができます。

<http://agilentgenomics.jp>

サポート ■ 実験前に必要な情報のダウンロードサイト をご参照ください。

表 2 SureSelect XT で使用可能なキャプチャライブラリリスト

SureSelect XT キャプチャライブラリ (ペイト)		マニュアル用		自動化用
		16反応分	96反応分	96反応分
SureSelect XT Human All Exon V6	Agilent	5190-8863	5190-8864	5190-8865
SureSelect XT Human All Exon V6 + UTRs	Agilent	5190-8881	5190-8882	5190-8883
SureSelect XT Human All Exon V6 + COSMIC	Agilent	5190-9307	5190-9308	5190-9309
SureSelect XT Human All Exon V5	Agilent	5190-6208	5190-6209	5190-6210
SureSelect XT Human All Exon V5+UTRs	Agilent	5190-6213	5190-6214	5190-6215
SureSelect XT Human All Exon V5+IncRNA	Agilent	5190-6446	5190-6447	5190-6448
SureSelect XT Human All Exon V5+Regulatory	Agilent	931071	931072	931073
SureSelect XT Focused Exome	Agilent	5190-7787	5190-7788	5190-7789
SureSelect XT Clinical Research Exome	Agilent	5190-7338	5190-7339	5190-7344
SureSelect XT Mouse All Exon	Agilent	5190-4641	5190-4642	5190-4643
SureSelect XT Mouse All Exon V2 (mm10 対応)	Agilent	EA	EA	EA
SureSelect XT NCC oncopanel	Agilent	931195	931196	931197
SureSelect XT カスタム 1 - 499 kb	Agilent	5190-4806	5190-4807	5190-4808
SureSelect XT カスタム 1 - 499 kb, 再発注	Agilent	5190-4811	5190-4812	5190-4813
SureSelect XT カスタム 0.5 - 2.9 Mb	Agilent	5190-4816	5190-4817	5190-4818
SureSelect XT カスタム 0.5 - 2.9 Mb, 再発注	Agilent	5190-4821	5190-4822	5190-4823
SureSelect XT カスタム 3.0 - 5.9 Mb	Agilent	5190-4826	5190-4827	5190-4828
SureSelect XT カスタム 3.0 - 5.9 Mb, 再発注	Agilent	5190-4831	5190-4832	5190-4833
SureSelect XT カスタム 6.0 - 11.9 Mb	Agilent	5190-4836	5190-4837	5190-4838
SureSelect XT カスタム 6.0 - 11.9 Mb, 再発注	Agilent	5190-4841	5190-4842	5190-4843
SureSelect XT カスタム 12.0 - 24.0 Mb	Agilent	5190-4896	5190-4897	5190-4898
SureSelect XT カスタム 12.0 - 24.0 Mb, 再発注	Agilent	5190-4901	5190-4902	5190-4903
ClearSeq キャプチャライブラリ (ペイト)				
ClearSeq SS Comprehensive Cancer	Agilent	5190-8011	5190-8012	5190-8013
ClearSeq SS 遺伝性疾患リサーチ	Agilent	5190-7518	5190-7519	5190-7520
ClearSeq SS DNA Kinome	Agilent	5190-4646	5190-4647	5190-4648
OneSeq キャプチャライブラリ (ペイト) SureSelect XT のみ対応				
OneSeq SS Constitutional Research	Agilent	5190-8702	5190-8703	5190-8704
OneSeq SS Hi Res Backbone + カスタム 1 - 499 kb,	Agilent	5190-8705	5190-8887	5190-8888
OneSeq SS Hi Res Backbone + カスタム 0.5 - 2.9 Mb	Agilent	5190-8889	5190-8890	5190-8891
OneSeq SS Hi Res Backbone + カスタム 3.0 - 5.9 Mb	Agilent	5190-8892	5190-8893	5190-8894
OneSeq SS Hi Res Backbone + カスタム 6.0 - 11.9 Mb	Agilent	5190-8895	5190-8896	5190-8897
OneSeq SS 1Mb CNV Backbone+カスタム 1 - 499 kb,	Agilent	5190-9462	5190-9463	5190-9464
OneSeq SS 1Mb CNV Backbone+カスタム 0.5 - 2.9 Mb	Agilent	5190-9465	5190-9466	5190-9467
OneSeq SS 1Mb CNV Backbone+カスタム 3.0 - 5.9 Mb	Agilent	5190-9468	5190-9469	5190-9470
OneSeq SS 1Mb CNV Backbone+カスタム 6.0 - 11.9 Mb	Agilent	5190-9471	5190-9472	5190-9473
OneSeq SS 1Mb CNV Backbone+カスタム 12.0 - 24 Mb	Agilent	5190-9474	5190-9475	5190-9476

1. はじめに

表 3 実験に必要な試薬

品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量/1反応あたり	内容量	備考
SureSelect XT 試薬キット						
SureSelect XT Reagents, イルミナHSQ/NSQ, 16 反応	Agilent	G9611A	—	1	16反応分	マルチプレックス対応
SureSelect XT Reagents, イルミナHSQ/NSQ, 96 反応	Agilent	G9611B	—	1	96反応分	マルチプレックス対応
SureSelect XT Reagents, イルミナMSQ, 16 反応	Agilent	G9612A	—	1	16反応分	マルチプレックス対応
SureSelect XT Reagents, イルミナMSQ, 96 反応	Agilent	G9612B	—	1	96反応分	マルチプレックス対応
その他の試薬						
品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量/1反応あたり	内容量	備考
ヘラクレス (Herculase) II DNA Polymerase	Agilent	600677	指定	2 uL	200 uL	dNTP溶液付きのタイプが必要です。大容量タイプ(600679,400uL)もあります。
Dynabeads MyOne Streptavidin T1	Life Technologies (ベリタス)	65601	指定	50 uL	2 mL	大容量タイプ(65602 10mL, 65603 100mL)もあります。
AMPure XP Kit (SPRI beads)	Beckman Coulter	A63880	指定	900 uL	5 mL	大容量タイプ(A63881 60mL, A63882 450mL)もあります。
1xLow TE Buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA)	Life Technologies	12090-015	相当	約 120 uL	100 mL	
Nuclease-free water (not DEPC-treated)	Life Technologies	AM9930	相当	約 2.4mL	500 mL	DEPC処理ではないこと
99.5% Ethanol, molecular biology grade	Wako	054-07225	相当		500 mL	98%以上、分子生物学用グレード。他の有機溶剤のコンタミネーションがないこと
70% Ethanol (for SPRI clean-up), molecular biology grade				最大8 mL		
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies	Q32850				スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies	Q32851				BRアッセイでは感度が足りないgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
オプション品となります。必要に応じてご利用ください						
Agilent NGS FFPE QC Kit	Agilent	G9700A (16反応) G9700B (96反応)			16反応分または96反応分	FFPE 由来DNAサンプルを使用する際のゲノムDNA QCに使用
Agilent QPCR NGSライブラリ定量キット(イルミナGA)	Agilent	G4880A	推奨	1ラン	5ラン分	1ランで最大21サンプルまで定量することができます。
Ethylene Glycol	Wako	055-00996	相当		500 mL	コバリスの冷却水循環溶液に、凍結防止のために添加します。
Tween 20	Sigma Aldrich	P9416-50ML	相当		50 mL	シーケンスライブラリの保存のために使用します。
※お持ちの電気泳動装置に応じ、TapeStation用もしくはバイオアナライザ用、いずれかの消耗品をご用意下さい。						
Agilent 4200 / 2200 TapeStation消耗品						
Agilent TapeStation D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5582	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation D1000 試薬キット	Agilent	5067-5583	指定	1ラン		112サンプル分
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 Screen Tape	Agilent	5067-5584	指定	1ラン	7枚	1枚で16サンプル測定できます。
Agilent TapeStation High Sensitivity D1000 試薬キット	Agilent	5067-5585	指定	1ラン		112サンプル分
Agilent TapeStation Genomic DNA ScreenTape	Agilent	5067-5365	推奨	1ラン	7枚	1枚で最大15サンプル測定できます。
Agilent TapeStation Genomic DNA 試薬キット	Agilent	5067-5366	推奨	1ラン		スタート時のgDNAの分解度評価に、アガロースゲル電気泳動の代わりに使用できます。
Agilent 2100 バイオアナライザ消耗品						
Agilent DNA 1000 kit	Agilent	5067-1504	指定	最大 2 ラン	25ラン分	3 ug スタート標準プロトコルで2ラン、200 ng スタートオプションプロトコルで1ラン。1ランで最大12サンプルまで流すことができます。
Agilent High Sensitivity DNA kit	Agilent	5067-4626	指定	最大2ラン	10ラン分	3 ug スタート標準プロトコルで1ラン、200 ng スタートオプションプロトコルで2ラン。1ランで最大11サンプルまで流すことができます。エキスパートソフトウェアVer B02.07以降が必要です。
※ 各キットについて、それぞれの大容量タイプはご利用いただけます。						

※大容量タイプがあるものはご利用いただけます。

※【試薬・消耗品の保証期間について】

アジレント製品の保証期間は、箱やチューブの入った小袋あるいはボトルに記載の Expiration date(Exp. date)までです。保証期間を過ぎた製品については欠品等があった場合も交換ができない場合がありますので、製品が納品されたらすぐに内容物を確認して下さい。

保証期間を過ぎると性能の保証ができないため、保証期間内に使用するよう計画して下さい。

※それぞれの試薬について、指定されている温度で保存してください。

※試薬はそれぞれの反応数分がはいっています。

※SureSelect オリゴキャプチャライブラリ(Bait)のカスタムデザインを eArray・SureDesign で行った場合は、デザイン ID(ELID)が、ご自身でデザインし、オーダーしたものと同一であることを確認してください。オリゴキャプチャライブラリのデザイン ID は、チューブラベルおよびチューブの入った箱のラベルに記載されています。

1. はじめに

実験に必要な装置、消耗品類

CAUTION

プロトコルの中には扱う液量が0.2 mLを超えるステップがあります。表 4に記載しているプレートまたはチューブ以外のプレートまたはチューブを使用する場合は、実験を始める前に3 µg プロトコルでは少なくとも0.31 mLの液量が入ることを、200 ng プロトコルでは少なくとも0.28 mLの液量が入ることを確認して下さい。扱う液量が多いステップでは、サンプルを1.5 mL チューブに移して処理をすることもできますが、スルーボットと収量に影響がある可能性があります。

表 4 実験に必要な装置、消耗品類

＜必要な機器、消耗品類＞						
品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量	内容量	備考
いずれかの電気泳動装置をご利用下さい。						
Agilent 4200 TapeStation System	Agilent	G2991AA	指定			DNAの定性または定量に使用することができます。
Agilent 2200 TapeStation System	Agilent	G2964AA / G2965AA	指定			DNAの定性または定量に使用することができます。
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent	G2943CA	指定			DNAの定性または定量に使用することができます。 Expert Control Software ver B.02.07以降が必要です
Covaris S-series Single Tube Sample Preparation System, Model S2	Covaris (エムエス機器)	Model S2	指定			Model E210, C-2000でも可能。 gDNAを再現性良く断片化するために必要。 ネブラライザの使用は推奨しません。
Covaris microTUBE with AFA fiber and snap cap	Covaris (エムエス機器)	520045	指定			Model S2用
Qubit®2.0 Fluorometer	Life Technologies	Q32866	推奨			スタート時のgDNAをできるだけ正確に定量するために用います。
サーマルサイクラー	Agilent	SureCycler	相当			65°C 24h のハイブリド、27µLの液が24µL以下まで蒸発しないこと (HotTop使用)
遠心分離機	Eppendorf	5417C	相当			
ストレプトアビジンの混合のため、旋回振盪機か96ウェルプレートミキサーのいずれかをご用意下さい。						
旋回振盪機	アズワン	ミニウエーブ WEV-03	相当			ストレプトアビジン溶液がチューブを上下してよく混ざるように、旋回運動をするタイプのもの。別売りの専用チューブブラック (WEB-03-12)と組み合わせると便利。
MS3 デジタル (96ウェルプレート対応ミキサー)	IKA	0003428000	相当			ストレプトアビジン溶液がウェル内でよく混ざるように、1,400 - 1,800 rpmでMix可能なもの。フルスカートのPCRプレートや8連チューブで使用する場合は別売りのPCRプレートアダプタメントが必要。
MS3.5 96ウェルプレート用アダプタメント	IKA	0003428000	相当			フルスカートのPCRプレートや8連チューブ使用時に上記MS3デジタルに装着して使用。
濃縮遠心機	トミー精工	CC-105	相当			45°C以下の低温で、50µLのDNA溶液が1～2時間程度で濃縮できること。 専用ロータ、冷却トラップTU-500と油回転真空ポンプGLD-051が必要。
Plateもしくは8 strip tubes 遠心機	クボタ または ワケンビータック	96ウェルプレート用 PlateSpin II (KUBOTA), 8 strip tubes用 卓上遠心機 プチチェンジ (ワケン)	相当			96ウェルプレートもしくは8 strip tubesのスピンダウン用
ビーズ分離用マグネット: 日本ジェネティクス FG-SSMAG2 (8連チューブ用) または Dynal DynaMag-96 Side skirted (96ウェルプレート、8連チューブ兼用)	日本ジェネティクス または Life Technologies	8連チューブ用 FG-SSMAG2, 96ウェルプレート用 12331D	相当			8連チューブで実験をする場合、8連チューブが独立して固定できるもの (日本ジェネティクス FG-SSMAG2など) 96ウェルプレート用マグネットはリング状に磁性ビーズが集まるタイプではなくウェルの一方に磁性ビーズが集まるタイプを推奨。

1. はじめに

SureCycler 8800 compatible 96-well tube plates またはoptical strip tubes	Agilent	410088 または 410092	相当	Plate 2枚 Strip Tube 4連	Strip Tubes 120本 PCR Plate 25プレート	65°C 24hのハイブリで、27uLの液が24uL以下まで蒸発しないこと。
Tube cap strips, domed	Agilent	410096	相当	キャップ 4連	strip caps 120本	65°C 24hのハイブリで、27uLの液が24uL以下まで蒸発しないこと。 HotTop対応のこと。
MicroAmp Clear Adhesive Film	Life Technologies	4306311	相当	4枚	100 films	PCRの機種によっては、Stripキャップのかわりにシールを使用できますが、液が蒸発しやすくなる場合があるので、十分な注意とテストが必要です。 65°C24hのハイブリで、27uLの液が24uL以下まで蒸発しないこと。 HotTop対応のこと。
Tube-strip capping tool	Agilent	410099	相当			PCRチューブのキャップを確実に密閉するために便利なツールです。
DNA LoBind チューブ、1.5ml PCR clean, 250 pieces	Eppendorf	95295-0030 108.051	相当	約28本	250本	核酸の吸着が少ないLoBindタイプを使用ください。
Qubit assay tubes	Life Technologies	Q32856				QubitでgDNAを正確に定量するために用います。
ピペット	Pipetman	P10, P20, P200, P1000	相当			
マルチチャンネルピペット	Rainin	L12-20	相当			SureSelectのハイブリダイゼーションを多検体で同時に行うときに便利です。
ピペットチップ 滅菌、Nuclease-Free、エアロゾルブロックフィルター付き						
滅菌済み コニカルチューブ、ポリプロピレン製、15 mL	アズワン	352097	相当			
パウダーフリー手袋 SAFE SKIN グローブ PRE (S, M, L サイズ)	Kimberly Clark	220, 330, 440 (S, M, Lサイズ)	相当			
アイスバケツ						
タイマー						
ボルテックスミキサー						
卓上遠心器	日本ミロボア	チビタンII	相当			
ヒートブロック (37°C)、1.5mLのチューブが入るタイプ						AM Pure XPビーズによる精製ステップで使用します。
ウオータバス (WashBuffer2のPreWarm 65°C)			相当			
オプション品となります。必要に応じてご利用ください						
品名	製造メーカー	品番	指定/推奨/相当品	必要量	内容量	備考
AriaMx リアルタイム定量PCRシステム	Agilent	G8830A	相当			キャプチャされたDNAライブラリを正確に定量するために用います。
AriaMx 96-well plates またはoptical Tube Strip	Agilent	401490 または 401493	相当			AriaMx リアルタイム定量PCRシステムを使用する際に用います。
Mx3000p/Mx3005P Optical Strip caps	Agilent	401425	相当			AriaMx リアルタイム定量PCRシステムを使用する際に用います。

※gDNA をロスなく再現性よく、かつ確実に 150-200 bp の長さに断片化するために、Covaris の使用が指定されています。Covaris の詳細については、エムエス機器株式会社にお問い合わせ下さい。

※65 °C、16 時間のハイブリダイゼーションに用いる PCR 装置、チューブまたは 96 well-plate とキャップは、必ず事前に 27 ul の液が 24 ul 以下に蒸発しないことを確認してから使用してください。

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)



2. サンプルの調製 (3ug DNA サンプル)

CAUTION

本プロトコルには、3 ug の DNA サンプル(標準 input 量)用のオプションと 200 ng の DNA サンプル(Low input 量)用のオプションが記載されています。適切な章を参照していることを確認して下さい。

以下は 3 ug の DNA サンプル用プロトコルであり、200 ng の DNA サンプル用プロトコルは 3 章を参照して下さい。

この章では、アジレントの **SureSelect^{XT}** キット(ポストプール式)を用い、イルミナ社のペアエンドマルチプレックスシーケンスプラットフォームに特化されたライブラリを調製する方法を説明します。マルチプレックスシーケンスを行うためのサンプルは、まずそれぞれ、個別にライブラリ調製、ハイブリダイゼーション、キャプチャを行います。キャプチャ後のサンプルを PCR 増幅するときに、あわせてインデックス(バーコード)シーケンスを各サンプルに付加します。SureSelect でキャプチャするターゲット領域のサイズに応じて、1 レーンあたり最大 96 サンプルまでプールして、マルチプレックスシーケンスを行います。イルミナのマルチプレックスシーケンスでは、1 ランに用いる 1 フローセルのすべてのレーンをマルチプレックスシーケンスにする必要があります。詳細はイルミナ社のプロトコルを参照ください。

イルミナ社のオリジナルプロトコルとは、下記に加え、PCR の条件などが異なりますのでご注意ください。

1. コバリスを用いて、150-200 bp をターゲットサイズとした gDNA の断片化を行います。
2. SureSelect^{XT} キットに含まれている試薬を使用します。
3. 各ステップでの DNA の精製は、ベックマン・コールター社のビーズを使って行います。

断片化サイズは、SureSelect のハイブリダイゼーションの効率に大きな影響を与えるため、gDNA の断片化について、コバリスおよび SureSelect QXT 以外の手法はバリデーションされていません。他の手法を使用した場合、保証およびサポートの対象外となります。

NOTE

実験には、OD₂₆₀/OD₂₈₀ の比が 1.8~2.0 の間にある高品質の gDNA を使用ください。
できるだけ正確に DNA を定量するために、Qubit システムの使用をお勧めします。

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

STEP1. DNA の断片化

マルチプレックスシーケンスを行う DNA のサンプルごとに、1 ライブラリを調製します。

12 サンプルをシーケンスする場合は、12 ライブラリを調製することになります。

1. Qubit dsDNA Assay キットを用いて、gDNA の濃度を測定します。実験には高品質の gDNA を用いるようにします。(分解しておらず、A260/A280 の比が 1.8-2.0 の間であること)
2. コバリスを起動します。起動してから脱ガスが完了するまで、30 分程度かかります。またこの段階で次に使用する AMPure XP ビーズを室温に戻しておくと便利です。
 - a. コバリスのウォーターバス内に、Milli-Q 水もしくは脱イオン水を注ぎます。使用する機種、チューブ、プレートなどにあわせ、コバリス社の推奨にしたがった水位とします。
 - b. コバリスのウォーターバスの水位を、マイクロチューブ (p/n 520045) のキャップより下面のガラスチューブ全体が浸かるように調整してください。
 - c. コバリスのウォーターバス内の水温が 5°C 程度になるように、外部循環冷却装置の水温を 2°C ~ 5°C の間に設定し、循環水の温度の表示が 5°C 以下になっているのを確認します。
 - d. (オプション) 外部循環冷却装置内の循環冷媒に、エチレングリコールを 20%[v/v] 程度添加すると、冷媒が凍結するのを防止することができます。
 - e. ソフトウェアのメインスクリーンから、DEGAS ボタンをクリックして、最低 30 分以上 DEGAS を実行してください。

コバリスの操作の詳細は、コバリス社のユーザーズガイドを参照ください。

3. DNA の吸着がおきない LoBind のチューブを用いて、Qubit で定量した gDNA 3 ug を 1x Low TE Buffer で 130 uL の容量になるように希釈します。
4. マイクロチューブ (P/N 520045) を、ローディングステーション (P/N 500142) の上に載せます。キャップがされた状態であることを確認してください。
5. 先がテーパ状になったピペットチップを用い、コバリスのマイクロチューブのキャップ上面にあるスリットにチップの先を差し込んで、サンプルの全量 (130 uL) を入れます。マイクロチューブ内に泡が残らないように注意してください (泡は超音波による gDNA の断片化を阻害します)。必ず Covaris 社指定のマイクロチューブを使用してください。
6. サンプルを入れたマイクロチューブを、コバリスのマイクロチューブホルダ (P/N 500114) にセットします。下表の設定により、gDNA の断片化を行います。ターゲットピークサイズは 150-200 bp です。

表 5 コバリス S220 の設定

設定	値
Duty Factor	10%
Peak Power	175.0
Cycles / Burst	200
Treatment	360 sec
温度	4°C から 8°C

コバリス S2 の設定

設定	値
Duty Cycle	10%
Intensity	5
Cycles per Burst	200
時間	60 秒、6 サイクル
セットモード	Frequency sweeping
温度	4°C から 7°C

- 断片化が終了したら、マイクロチューブをマイクロチューブフォルダから取り出し、ローディングステーションの上に再度載せます。
- マイクロチューブのふたはそのままの状態、セプタからピペットチップの先を差し込み、中サンプル全量を、ピペットを用いてゆっくり吸引します。
- 断片化されたサンプル全量を新しい 96 ウェルプレートもしくは 8 strip tube (もしくは 1.5mL チューブ)に移します。この後のステップで、選択したチューブサイズに適合したビーズ分離用のマグネットが必要となります。

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

STEP2. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

NOTE

このプロトコルでは、96 ウェルプレートでサンプル処理を行うことを想定しています。サンプル数が少ない場合は、ご使用のサーマルサイクラーやマグネットスタンドに合った 8 strip tube や個別のチューブを使用することができます。

このステップの 4–7 では、液量が 0.31 mL になります。推奨のプレートまたはチューブ以外のプレートまたはチューブを使用する場合は、実験を始める前にこの液量が入ることを確認して下さい。1.5 mL チューブ用のマグネットスタンドをお持ちの場合は、このステップでは 1.5 mL のチューブを用いることができます。その場合、70%エタノール溶液は、各 500 μ L ずつ使用してください。

以下のステップでは、96 ウェルプレートもしくは 8 strip tube を用いていますが、AMPureXP ビーズ溶液と DNA サンプルを混ぜた時点で、チューブの液量はほぼいっぱいとなり、ピペットによる混合には細心の注意が必要です。

以下の各ステップでは、PCR プレートもしくは 8 strip tube の Cap Strip をステップごとに外す必要があります。再びキャップをするときには、常に新しい Cap Strip を使用することを推奨します。一度使用した Cap Strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。ご注意ください。

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラーを 37 °C に設定しておきます。
2. 1 サンプルあたり 400 μ L (+ 余剰分) の 70 %エタノールを準備します。

NOTE

当日中に使用する分の 70 %エタノールは一度に作成することができます。ライブラリ調製プロトコル全体では、1 サンプルあたり 2 mL の 70 %エタノールが必要です。

3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサーでよく混合します。
4. 前項の STEP1 で調製した断片化済みの DNA サンプル 130 μ L が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 180 μ L を、注意して加えます。液がチューブほぼいっぱいになりますので、液を溢れさせないようによく注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
5. 室温で、5 分間インキュベーションします。
6. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。(磁石スタンドによっては、5 分たっても溶液中にビーズが懸濁して残っている場合があります。そのときには、まず透明な上澄み液をチューブの底の方から 100 uL 程度取り除き、さらに 3 分間インキュベーションした後に、残った上澄み液を取り除くようにしてください。)
8. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。(1.5mL のチューブを用いた際には 70%エタノール溶液を、500 uL ずつ加えてください。)
9. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
10. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
11. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドアウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
12. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37 °C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
13. 50 uL の Nuclease-free 水を加えてキャップをし、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドアウンします。
14. 室温で 2 分間インキュベーションします。
15. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
16. 上澄み液 約 48 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20 °C で保管することができます。

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

STEP3. 電気泳動による品質(サイズ)チェック

【バイオアナライザの DNA 1000 チップと試薬キットを使う場合】

バイオアナライザの和文ガイドブックは下記ウェブサイトからダウンロードいただくことができます。

<http://Agilentgenomics.jp>

初めてサポートサイトへアクセスされる方は、アクセス方法について、本プロトコル最終ページの問い合わせ窓口にお問い合わせください。

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350uL は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(version B.02.02 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックし、サンプル名・コメントを記入します。
7. 結果をチェックします。下記の泳動図のような分布が得られ、150-200 bp 付近の位置にピークトップがあることを確認します。

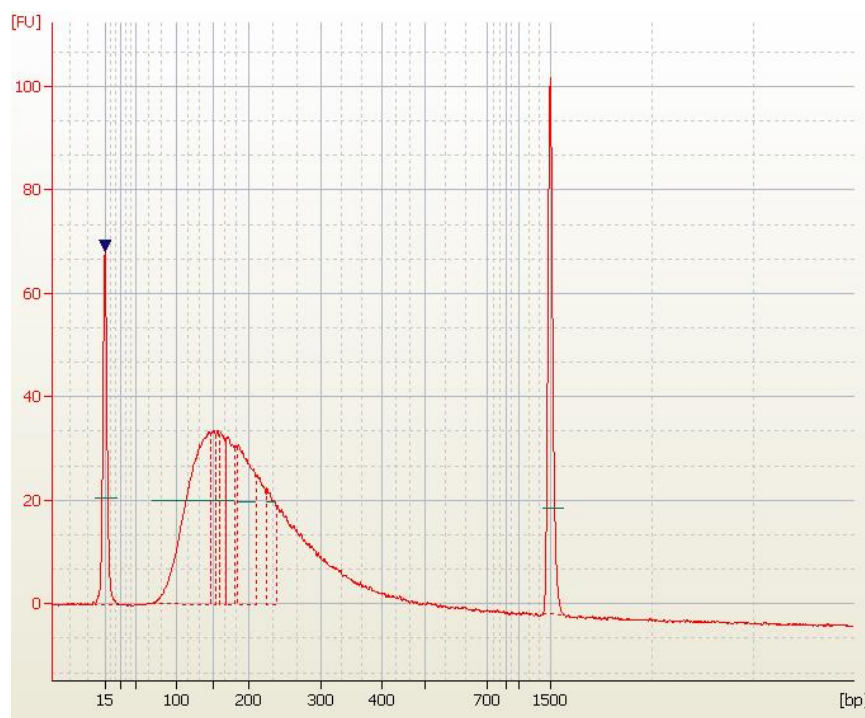


図 2 断片化した gDNA のバイオアナライザ DNA1000 アッセイによる泳動図。

150-200 bp 付近の位置にピークトップが見られます。

【4200 / 2200 TapeStation と D1000 Screen Tape を使う場合】

NOTE

D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5582) と D1000 Reagents (Agilent p/n 5067-5583) を使用する方法を選択することもできます。詳細は Agilent TapeStation User Manual を参照してください。

1. Agilent TapeStation User Manual を参照してサンプルを準備して下さい。断片化された DNA サンプルを 1 uL 取り、D1000 sample buffer 3 uL と混合します。

CAUTION

正確な定量のために、DNA と D1000 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合して下さい。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合してください。

2. Agilent TapeStation User Manual を参照して、Step1 のサンプルプレートかストリップチューブ、D1000 ScreenTape と Loading tip を TapeStation にセットします。ランを開始します。
3. 結果をチェックします。下図の泳動図のような分布が得られ、150-200 bp 付近にピークトップがみられることを確認します。

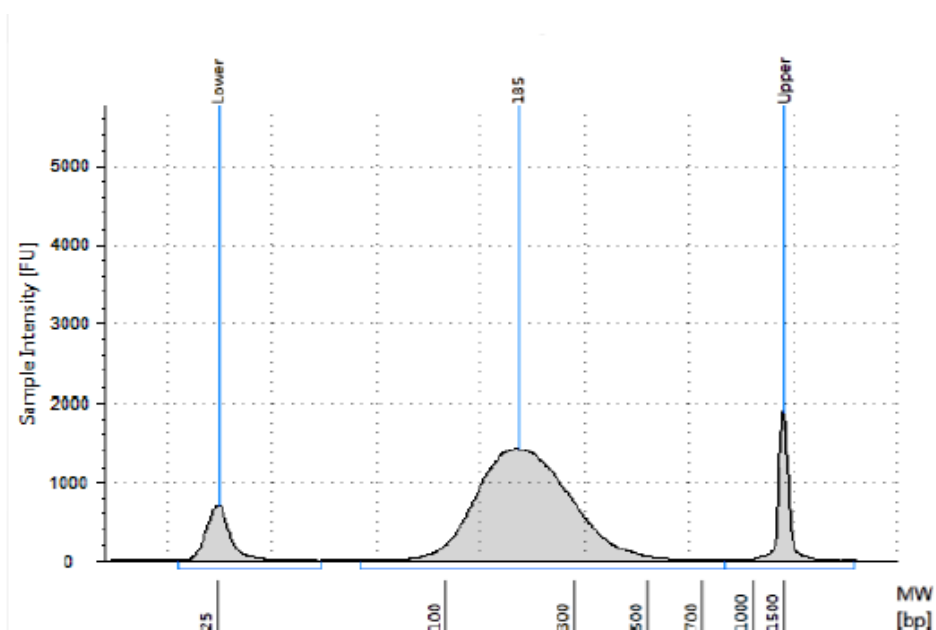


図 3 断片化した gDNA の 2200 TapeStation と D1000 ScreenTape による泳動図。

150-200 bp 付近の位置に平均サイズがあることを確認します。

Stopping Point

次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは 4℃で一晩、それ以上の長期であれば -20℃で保管することができます。

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

STEP4. 末端修復

複数のサンプルを調製する場合には、各ステップで Master Mix を作製できます。16 サンプルを同時に調製する場合の例(ピペットロスを考慮した量)がそれぞれの表に示されています。

SureSelect XT Library Prep Kit, ILM を使用します。

マスターミックスの調製は、氷上で行います。

1. 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)

- 下表に従って、サンプル数に応じた反応液を氷上で作製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ボルテックスで溶液をよく混合します。

表 6 エンドリペアミックス*

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	35.2 µL	580.8 µL
10× End Repair Buffer (clear cap)	10 µL	165 µL
dNTP Mix (green cap)	1.6 µL	26.4 µL
T4 DNA Polymerase (purple cap)	1 µL	16.5 µL
Klenow DNA Polymerase (yellow cap)	2 µL	33 µL
T4 Polynucleotide Kinase (orange cap)	2.2 µL	36.3 µL
Total	52 µL	858 µL

* SureSelect XT Library Prep Kit, ILM に含まれます。

- DNA サンプル 48 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、a.で調製したエンドリペアミックスを 52 uL ずつ加えます。ピペッティングによりサンプル溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。

2. サーマルサイクラを用い、20°Cで 30 分間、インキュベーションします。サーマルサイクラの heating lid(ふた)は加熱しないように注意してください。インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 7 末端修復のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	20°C	30 minutes
Step 2	4°C	Hold

STEP5. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
3. 前項の STEP4 で調製した末端修復後の DNA サンプル 100 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 180 uL を、注意して加えます。液がチューブほぼいっぱいになりますので、液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。(1.5 mL のチューブを用いることも可能です。)
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。(1.5 mL のチューブを用いた際には 70%エタノール溶液を、500 uL ずつ加えてください。)
8. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
12. 32 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
15. 上澄み液 約 30 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

Stopping Point 次のステップに進まない場合、このサンプルは -20°C で保管することができます。

STEP6. DNA 断片の 3'end に A オーバーハング付加

SureSelect XT Library Prep Kit, ILM を使用します。

1. 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)
 - a. 下表に従って、サンプル数に応じた反応液を作成します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ボルテックスで溶液をよく混合します。

表 8 A オーバーハング付加*

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	11 µL	181.5 µL
10× Klenow Polymerase Buffer (blue cap)	5 µL	82.5 µL
dATP (green cap)	1 µL	16.5 µL
Exo(−) Klenow (red cap)	3 µL	49.5 µL
Total	20 µL	330 µL

* SureSelect Library Prep Kit, ILM に含まれます。

- b. DNA サンプル 30 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、a.で調製した A オーバーハング付加マスターミックスを 20 uL ずつ加えます。ピペッティングによりサンプル溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。
2. サーマルサイクラを用い、37°Cで 30 分間、インキュベーションします。サーマルサイクラの heating lid(ふた)は 50 °C以上に加熱しないように注意してください。インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 9 A オーバーハング付加のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	37°C	30 minutes
Step 2	4°C	Hold

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

STEP7. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
3. 前項の STEP6 で調製した A オーバーハング付加後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
8. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
12. 15 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
15. 上澄み液 約 13 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。
16. 次のステップに速やかに進んでください。ここで実験を止めることはできません。

STEP8. インデックス用アダプターライゲーション

SureSelect XT Library Prep Kit, ILM を使用します。

1. 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)
 - a. 下表に従って、サンプル数に応じた反応液を作製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ピペッティングにより、溶液を静かに混合します。

表 10 ライゲーションマスターミックス*

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	15.5 µL	255.75 µL
5× T4 DNA Ligase Buffer (green cap)	10 µL	165 µL
SureSelect Adaptor Oligo Mix (brown cap)	10 µL	165 µL
T4 DNA Ligase (red cap)	1.5 µL	24.75 µL
Total	37 µL	610.5 µL

* SureSelect Library Prep Kit, ILM に含まれます。

- b. DNA サンプル 13 uL の入った PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、a. で調製したライゲーションマスターミックスを 37 uL ずつ加えます。ピペッティングによりサンプル溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。
2. 20 °Cで 15 分間、インキュベーションします。サーマルサイクラの heating lid(ふた)は加熱しないように注意してください。インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 11 ライゲーションのサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	20°C	15 minutes
Step 2	4°C	Hold

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20 °Cで保管することができます。

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

STEP9. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
3. 前項の STEP8 で調製したアダプターライゲーション後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
8. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
12. 32 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
15. 上澄み液 約 32 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20 °C で保管することができます。

STEP10. アダプター付き DNA ライブラリの増幅

以下の表に示す試薬を使用してください。

表 12 アダプター付き DNA ライブラリの増幅に使用する試薬

Component	Storage Location
SureSelect Primer	SureSelect XT Library Prep Kit ILM, -20°C
SureSelect ILM Indexing Pre-Capture PCR Reverse Primer	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box 2, -20°C
Herculase II Fusion DNA Polymerase	Herculase II Fusion DNA Polymerase kit, -20°C
5× Herculase II Reaction Buffer	Herculase II Fusion DNA Polymerase kit*, -20°C
100 mM dNTP Mix	Herculase II Fusion DNA Polymerase kit*, -20°C

*ヘラクレス (Herculase) II DNA Polymerase に付属している試薬を必ず使用してください。他のキットの試薬を代わりに使用しないようにしてください。

このプロトコルでは、前項で調製した両端にアダプターライゲーションされた DNA 断片の半分の量を使用します。残りの半量は、-20°Cで保管してください。

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐために、PCR 反応液の調製はラボで決められたクリーンエリアか、UV ランプを備えた PCR フードにて陽圧の環境下で実施してください。

1. 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。
 - a. 以下の表に従って、サンプル数に応じた反応液を氷上で作製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ボルテックスで溶液をよく混合します。
 - b. 35 μ L の反応液をそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。
 - c. 各 DNA サンプル 15 μ L をそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。ピペッティングによりサンプル溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。

表 13 PCR 反応液

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	21 μ L	346.5 μ L
SureSelect Primer (brown cap)	1.25 μ L	20.6 μ L
SureSelect ILM Indexing Pre-Capture PCR Reverse Primer (clear cap)	1.25 μ L	20.6 μ L
5 $\times$ Herculanase II Reaction Buffer (clear cap)	10 μ L	165 μ L
100 mM dNTP Mix (green cap)	0.5 μ L	8.25 μ L
Herculanase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 μ L	16.5 μ L
Total	35 μL	577.5 μL

2. 以下の表のサーマルサイクラプログラムに従って、増幅を行います。ここで次のステップで用いる AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 14 サーマルサイクラプログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	4–6	98°C	30 seconds
		65°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	10 minutes
4	1	4°C	Hold

NOTE

用いる DNA の品質の違いにより、ライブラリ調製の結果は、サンプルごとに少し異なります。ほとんどのケースでは、5 サイクルの増幅により、バイアスを抑え、かつ非特異的な増幅がない状態で、引き続くシーケンスキャプチャに足る収量を得ることができます。もし収量が低すぎるか、より大きな分子量の非特異的な増幅が見られる場合は、増幅に用いなかった残りの半量のライブラリのテンプレートを使って、サイクル数を最適化して増幅してください。

もしくは別の確認方法として、以下の方法でテストランを行うことができます。PCR mix 溶液を各 10 uL の溶液量になるように3本に分けて、4,5,6 サイクルをそれぞれ試します。この 10uL の反応液量のサンプルを次の STEP11 で AMPure XP ビーズで精製するにあたっては、30 uL の AMPure XP ビーズ溶液を用い、20 uL の Nuclease-free 水で溶出させます。続いて STEP12 でバイオアナライザを用いて、サイズと濃度の確認をします。

サイクル数を最適化した後に、50uL の量で再度 PCR を行ってください。

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

STEP11. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
3. 前項の STEP10 で調製した PCR 増幅後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
8. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
12. 30 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
15. 上澄み液 約 30 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20 °C で保管することができます。

STEP12. 電気泳動による DNA サンプルのサイズチェックと定量

精製、増幅したアダプター付き DNA ライブラリのサイズと濃度をバイオアナライザ DNA1000 アッセイもしくは 2200 TapeStation を用いて測定します。

【バイオアナライザの DNA 1000 チップと試薬キットを使う場合】

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350 uL は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(version B.02.02 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。以下の泳動図のように、約 225 bp-275 bp の位置にスミアなシングルピークがあることを確認します。このスミアピークの濃度をバイオアナライザのマニュアルインテグレーション機能を用いて、測定します。

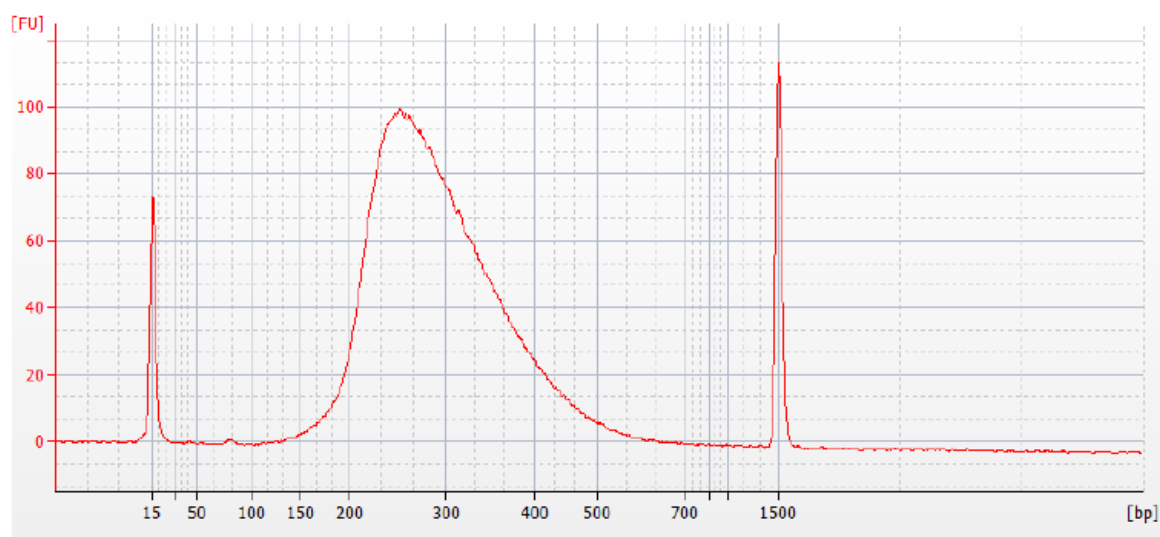


図 4 増幅されたアダプター付き DNA ライブラリの DNA1000 アッセイの泳動図。
225 bp-275 bp の位置に、シングルスミアピークのピークトップが観察される。

2. サンプルの調製 (3 ug DNA サンプル)

【4200 / 2200 TapeStation と D1000 Screen Tape を使う場合】

NOTE

バイオアナライザの代わりに D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5582) と D1000 Reagents (Agilent p/n 5067-5583) を使用する方法を選択することもできます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してください。

1. Agilent TapeStation User Manual を参照してサンプルを準備して下さい。増幅された DNA サンプルを 1 uL 取り、D1000 sample buffer 3 uL と混合します。

CAUTION

正確な定量のために、DNA と D1000 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合して下さい。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合してください。

2. Agilent TapeStation User Manual を参照して、Step1 のサンプルプレートかストリップチューブ、D1000 ScreenTape と Loading tip を TapeStation にセットします。ランを開始します。
3. 結果をチェックします。以下図の泳動図のような分布が得られ、225 bp から 275 bp 付近の位置に、シングルスミアピークのピークトップがあることを確認します。

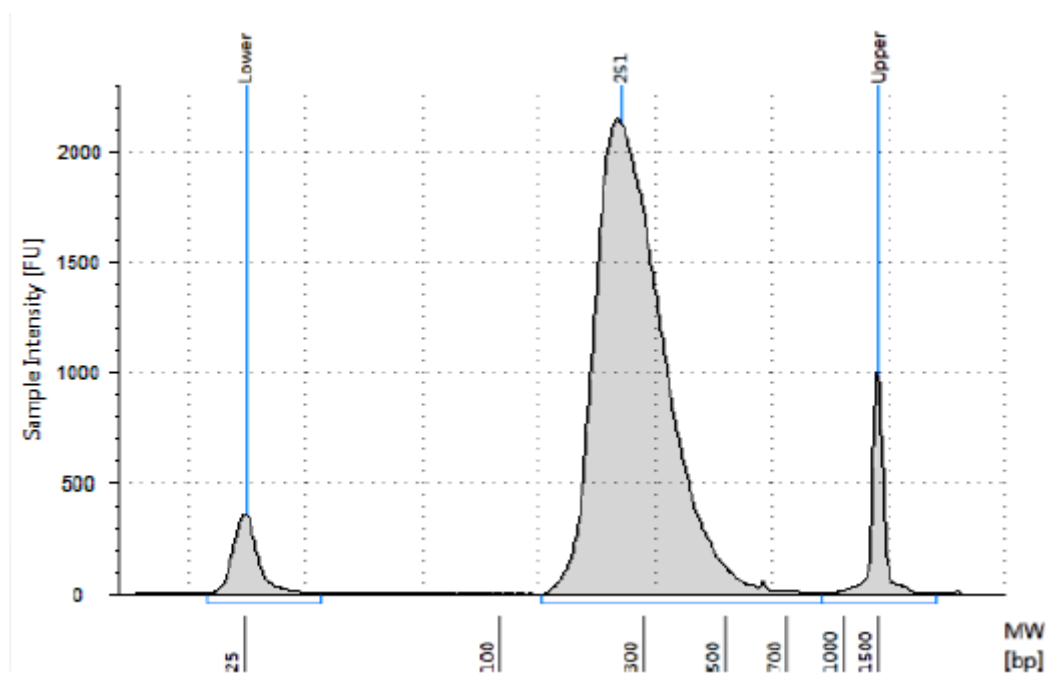


図 5 増幅したライブラリ DNA の 2200 TapeStation と D1000 ScreenTape による泳動図。225 bp から 275 bp 付近の位置に、シングルスミアピークのピークトップが見られます。



3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

CAUTION

本プロトコルには、3 ug の DNA サンプル(標準 input 量)用のオプションと 200 ng の DNA サンプル(Low input 量)用のオプションが記載されています。適切な章を参照していることを確認して下さい。

以下は 200 ng の DNA サンプル用プロトコルであり、3 ug の DNA サンプル用プロトコルは 2 章を参照して下さい。

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

この章では、アジレントの **SureSelect^{XT}** キット(ポストプール式)を用い、イルミナ社のペアエンドマルチプレックスシーケンスプラットフォームに特化されたライブラリを調製する方法を説明します。マルチプレックスシーケンスを行うためのサンプルは、まずそれぞれ、個別にライブラリ調製、ハイブリダイゼーション、キャプチャを行います。キャプチャ後のサンプルを PCR 増幅するときに、あわせてインデックス(バーコード)シーケンスを各サンプルに付加します。SureSelect でキャプチャするターゲット領域のサイズに応じて、1 レーンあたり最大 96 サンプルまでプールして、マルチプレックスシーケンスを行います。イルミナのマルチプレックスシーケンスでは、1 ランに用いる 1 フローセルのすべてのレーンをマルチプレックスシーケンスにする必要があります。詳細はイルミナ社のプロトコルを参照ください。

イルミナ社のオリジナルプロトコルとは、下記に加え、PCR の条件などが異なりますのでご注意ください。

1. コバリスを用いて、150-200 bp をターゲットサイズとした gDNA の断片化を行います。
2. SureSelect^{XT} キットに含まれている試薬を使用します。
3. 各ステップでの DNA の精製は、ベックマン・コールター社のビーズを使って行います。

断片化サイズは、SureSelect のハイブリダイゼーションの効率に大きな影響を与えるため、gDNA の断片化について、コバリス以外の手法はバリデーションされていません。他の手法を使用した場合、保証およびサポートの対象外となります。

NOTE

実験には、OD260/280 の比が 1.8~2.0 の間にある高品質の gDNA を使用ください。できるだけ正確に DNA を定量するために、Qubit システムの使用をお勧めします。

STEP1. DNA の断片化

NOTE

実験には高品質の gDNA を用いるようにします (分解しておらず、A260/A280 の比が 1.8-2.0 の間であること)。適切な Qubit dsDNA Assay キットを用いて、gDNA の濃度を測定します。

FFPE 由来の gDNA サンプルを用いる場合、ライブラリ調製を開始する前に 87 ページの Appendix にある FFPE サンプル向けのプロトコル改変の詳細をご確認ください。

マルチプレックスシーケンスを行う DNA のサンプルごとに、1 ライブラリを調製します。

16 サンプルをシーケンスする場合は、16 ライブラリを調製することになります。

1. コバリスを起動します。起動してから脱ガスが完了するまで、30 分程度かかります。またこの段階で次に使用する AMPure XP ビーズを室温に戻しておくとう便利です。
 - a. コバリスのウォーターバス内に、Milli-Q 水もしくは脱イオン水を注ぎます。使用する機種、チューブ、プレートなどにあわせ、コバリス社の推奨にしたがった水位とします。
 - b. コバリスのウォーターバスの水位を、マイクロチューブ (p/n 520045) のキャップより下面のガラスチューブ全体が浸かるように調整してください。
 - c. コバリスのウォーターバス内の水温が 5°C 程度になるように、外部循環冷却装置の水温を 2°C ~ 5°C の間に設定し、循環水の温度の表示が 5°C 以下になっているのを確認します。
 - d. (オプション) 外部循環冷却装置内の循環冷媒に、エチレングリコールを 20% [v/v] 程度添加すると、冷媒が凍結するのを防止することができます。
 - e. ソフトウェアのメインスクリーンから、DEGAS ボタンをクリックして、最低 30 分以上 DEGAS を実行してください。

コバリスの操作の詳細は、コバリス社のユーザーズガイドを参照ください。

2. マイクロチューブ (P/N 520045) を、ローディングステーション (P/N 500142) の上に載せます。キャップがされた状態であることを確認してください。
3. Qubit dsDNA Assay をもちいて gDNA の濃度を測定します。

NOTE

FFPE 由来の gDNA サンプルで分解が進んでいる場合、qPCR で決定された、増幅可能な DNA の濃度を参照し、100-200 ng の範囲で最大量の DNA を使用します。FFPE サンプル向けのプロトコル改変の詳細については、6. Appendix : FFPE 由来 DNA サンプルの使用を参照してください。

4. DNA の吸着がおきない LoBind のチューブを用いて、gDNA 200 ng を 1x Low TE Buffer で 50 µL の容量になるように溶解します。
5. 先がテーパ状になったピペットチップを用い、コバリスのマイクロチューブのキャップ上面にあるス

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

リットにチップの先を差し込んで、サンプルの全量(50 μ L)を入れます。マイクロチューブ内に泡が残らないように注意してください(泡は超音波による gDNA の断片化を阻害します)。必ず Covaris 社指定のマイクロチューブを使用してください。

6. サンプルを入れたマイクロチューブを、コバリスのマイクロチューブフォルダ (P/N 500114) にセットします。以下の表の設定により、gDNA の断片化を行います。ターゲットピークサイズは 150-200 bp です。

NOTE

FFPE 由来の gDNA サンプルを用いる場合、断片化の時間を 6 分から 4 分に短縮します。FFPE サンプル向けのその他の改変点については 6. Appendix : FFPE 由来 DNA サンプルの使用を参照してください。

表 15 コバリス S220 の設定

設定	値
Duty Factor	10%
Peak Power	175.0
Cycles / Burst	200
Treatment	360 sec 注)
温度	4°C から 8°C

コバリス S2 の設定

設定	値
Duty Cycle	10%
Intensity	5
Cycles per Burst	200
時間	60 秒、6 サイクル 注)
セットモード	Frequency sweeping
温度	4°C から 7°C

注) 180 秒の断片化ののち、マイクロチューブをスピンドウンして溶液を底に集め、再び 180 秒の断片化を行うことで、不完全な断片化を回避することができます。

7. 断片化が終了したら、マイクロチューブをマイクロチューブフォルダから取り出し、ローディングステーションの上に再度載せます。
8. マイクロチューブのふたはそのままの状態、セプタからピペットチップの先を差し込み、中のサンプル全量を、ピペットを用いてゆっくり吸引します。
9. 断片化されたサンプル全量を新しい 96 ウェルプレートもしくは 8 Strip tube (もしくは 1.5 mL チューブ)に移します。この後のステップで、選択したチューブサイズに適合したビーズ分離用のマグネットが必要となります。

STEP2. 電気泳動による品質(サイズ)チェック (オプション)

【バイオアナライザの High Sensitivity DNA チップと試薬キットを使う場合】

SureSelect XT Low Input Option (200 ng DNA サンプル)には**高感度 DNA キット**が必要です。

バイオアナライザの和文ガイドブックは下記ウェブサイトからダウンロードすることができます。

<http://Agilentgenomics.jp>

初めてサポートサイトへアクセスされる方は、アクセス方法について、本プロトコル最終ページの問い合わせ窓口にお問い合わせください。

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350 uL は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(**version B.02.07** もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。下記の泳動図のような分布が得られ、120-150 bp 付近の位置にピークトップがあることを確認します。

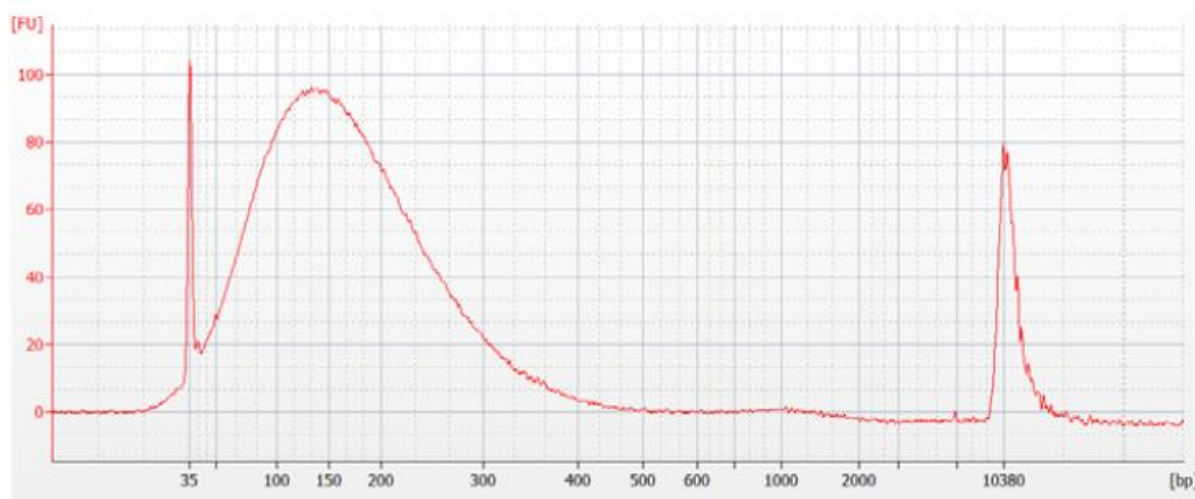


図 6 断片化した gDNA のバイオアナライザ高感度 DNA アッセイによる泳動図
120-150 bp 付近の位置にピークトップが見られます。

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

STEP3. 末端修復

複数のサンプルを調製する場合には、各ステップで Master Mix を作製できます。16 サンプルを同時に調製する場合の例(ピペットロスを考慮した量)がそれぞれの表に示されています。

SureSelect XT Library Prep Kit, ILM を使用します。

マスターミックスの調製は、氷上で行います。

以下の各ステップでは、PCR プレートもしくは 8 strip tube の Cap Strip をステップごとに外す必要があります。再びキャップをするときには、常に新しい Cap Strip を使用することを推奨します。一度使用した Cap Strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。ご注意ください。

1. 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)

- a. 表 15 に従って、サンプル数に応じた反応液を氷上で作製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ボルテックスで溶液をよく混合します。

表 16 エンドリペアミックス*

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	35.2 µL	580.8 µL
10× End Repair Buffer (clear cap)	10 µL	165 µL
dNTP Mix (green cap)	1.6 µL	26.4 µL
T4 DNA Polymerase (purple cap)	1 µL	16.5 µL
Klenow DNA Polymerase (yellow cap)	2 µL	33 µL
T4 Polynucleotide Kinase (orange cap)	2.2 µL	36.3 µL
Total	52 µL	858 µL

* SureSelect XT Library Prep Kit, ILM に含まれます。

- b. 断片化した DNA サンプル(約 48-50 uL)のはいった PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、a. で調製したエンドリペアミックスを 52 uL ずつ加えます。ピペッティングによりサンプル溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

2. サーマルサイクラを用い、20°Cで 30 分間、インキュベーションします。サーマルサイクラの heating lid(ふた)は加熱しないように注意してください。インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 17 末端修復のサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	20°C	30 minutes
Step 2	4°C	Hold

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

STEP4. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. 70%エタノールを 1 サンプルあたり 400 μ L(+余剰分) 準備します。

NOTE

新しく調製した 70%エタノールはその日の間のみ、以降の精製ステップでも使用することができます。

ライブラリ調製プロトコル全体では 1 サンプルあたり 1.6 mL の 70%エタノールが必要です。

3. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ビーズ溶液をボルテックスミキサでよく混合します。前項の STEP3 で調製した末端修復後の DNA サンプル 100 μ L が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 180 μ L を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。(1.5 mL のチューブを用いることも可能です。)
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。(磁石スタンドによっては、5 分たっても溶液中にビーズが懸濁して残っている場合があります。そのときには、まずチューブの底の方から透明な上澄み液を 100 μ L 程度取り除き、さらに 3 分間インキュベーションした後に、残った上澄み液を取り除くようにしてください。)
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 μ L ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。(1.5 mL のチューブを用いた際には 70%エタノール溶液を、500 μ L ずつ加えてください。)
8. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 μ L の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。

12. 32 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
15. 上澄み液 約 30 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20°C で保管することができます。

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

STEP5. DNA 断片の 3'end に A オーバーハング付加

SureSelect XT Library Prep Kit, ILM を使用します。

以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)

- a. 以下の表にしたがって、サンプル数に応じた反応液を作成します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ボルテックスで溶液をよく混合します。

表 18 A オーバーハング付加*

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	11 µL	181.5 µL
10× Klenow Polymerase Buffer (blue cap)	5 µL	82.5 µL
dATP (green cap)	1 µL	16.5 µL
Exo(–) Klenow (red cap)	3 µL	49.5 µL
Total	20 µL	330 µL

* SureSelect XT Library Prep Kit, ILM に含まれます。

- b. DNA サンプル 30 µL のはいった PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、a. で調製した A オーバーハング付加マスターミックスを 20 µL ずつ加えます。ピペッティングによりサンプル溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。
2. サーマルサイクラを用い、37°C で 30 分間、インキュベーションします。サーマルサイクラの heating lid (ふた) は 50°C 以上に加熱しないように注意してください。インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 19 A オーバーハング付加サーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	37°C	30 minutes
Step 2	4°C	Hold

STEP6. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
3. 前項の STEP5 で調製した A オーバーハング付加後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、**ビーズを吸い込まないように注意して**、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
8. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
12. 15 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
15. 上澄み液 約 13 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。
16. 次のステップに速やかに進んでください。ここで実験を止めることはできません。

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

STEP7. インデックス用アダプターライゲーション

SureSelect XT Library Prep Kit, ILM を使用します。

1. 使用する直前に、SureSelect Adaptor Oligo Mix (茶キャップ) を Nuclease-free 水で 1:10 に希釈します。希釈液の必要量は、表 19 の「希釈済 SureSelect Adaptor Oligo Mix」の量を参照して下さい。次のステップでは、この 1/10 希釈済みの Oligo Mix を使用します。

NOTE

FFPE 由来の gDNA サンプルを用いる場合、希釈は行わず、SureSelect Adaptor Oligo Mix の原液を以下の反応に用います。FFPE サンプル向けのそのほかの改変点については 6. Appendix : FFPE 由来 DNA サンプルの使用を参照してください。

2. 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。(氷上で調製)
 - a. 以下の表に従って、サンプル数に応じた反応液を作製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ピペティングにより、溶液を静かに混合します。

表 20 ライゲーションマスターミックス*

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	15.5 µL	255.75 µL
5× T4 DNA Ligase Buffer (green cap)	10 µL	165 µL
希釈済 SureSelect Adaptor Oligo Mix from step 1	10 µL	165 µL
T4 DNA Ligase (red cap)	1.5 µL	24.75 µL
Total	37 µL	610.5 µL

* SureSelect XT Library Prep Kit, ILM に含まれます。

- b. DNA サンプル 13 µL のはいった PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、a. で調製した ライゲーションマスターミックスを 37 µL ずつ加えます。ピペティングによりサンプル溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。
3. 20 °C で 15 分間、インキュベーションします。サーマルサイクラの heating lid (ふた) は加熱しないように注意してください。インキュベーションをスタートする際に、次に使用する AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 21 ライゲーションサーマルサイクラプログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	20°C	15 minutes
Step 2	4°C	Hold

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20 °Cで保管することができます。

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

STEP8. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
3. 前項の STEP7 で調製したアダプターライゲーション後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
8. 溶液が透明になるまで、そのまま 1 分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
12. 32 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
15. 上澄み液 約 30 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20 °C で保管することができます。

STEP9. アダプター付き DNA ライブラリの増幅

以下に示す表の試薬を使用してください。

表 22 アダプター付き DNA ライブラリの増幅に使用する試薬

Component	Storage Location
SureSelect Primer (brown cap)	SureSelect XT Library Prep Kit ILM, -20°C
SureSelect ILM Indexing Pre-Capture PCR Reverse Primer (clear cap)	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box 2, -20°C
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	Herculase II Fusion DNA Polymerase kit, -20°C
5× Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	Herculase II Fusion DNA Polymerase kit*, -20°C
100 mM dNTP Mix (green cap)	Herculase II Fusion DNA Polymerase kit*, -20°C

*ヘラクレス(Herculase) II Fusion DNA Polymerase に付属している試薬を必ず使用してください。他のキットの試薬を代わりに使用しないようにしてください。

この Low Input オプションプロトコルでは、前項で調製した両端にアダプターライゲーションされた DNA ライブラリを全量次の PCR に使用します。半量を用いて残りの半量を -20°C で保管する、標準 (3 ug) プロトコルと異なりますのでご注意ください。また PCR サイクル数も異なりますので、ご注意ください。

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐために、PCR 反応液の調製はラボで決められたクリーンエリアか、UV ランプを備えた PCR フードにて陽圧の環境下で実施してください。

1. 以下の手順でマスターミックスを調製し、DNA サンプルと混合します。
 - a. 以下の表に従って、サンプル数に応じた反応液を氷上で作製します。表の 16 ライブラリ分の量は 1 ライブラリ分の約 1.03 倍の量で計算されています。ボルテックスで溶液をよく混合します。

表 23 PCR 反応液

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	6 µL	99.0 µL
SureSelect Primer (brown cap)	1.25 µL	20.6 µL
SureSelect ILM Indexing Pre-Capture PCR Reverse Primer (clear cap)	1.25 µL	20.6 µL
5× Herculase II Reaction Buffer (clear cap)	10 µL	165 µL
100 mM dNTP Mix (green cap)	0.5 µL	8.3 µL
Herculase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µL	16.5 µL
Total	20 µL	330 µL

- b. 各 DNA サンプル 30 µL のはいた PCR プレートもしくは 8 strip tube の各ウェルに、a. で調製した PCR 反応液を 20 µL ずつ加えます。ピペッティングによりサンプル溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。

2. 以下の表の PCR プログラムに従って、増幅を行います。ここで次のステップで用いる AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 24 PCR プログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	10	98°C	30 seconds
		65°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	10 minutes
4	1	4°C	Hold

NOTE

FFPE 由来の gDNA サンプルを用いる場合、DNA の品質によっては増幅のサイクル数を変更する必要があります。89 ページ、および 90 ページに記載の、DNA integrity score に基づくサイクル数の推奨を参照してください。

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

STEP10. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
3. 前項の STEP9 で調製した PCR 増幅後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペッティングを 10 回程度行い、液をよく混合します。
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
8. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 7 と 8 のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
12. 30 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。
15. 上澄み液 約 30 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20 °C で保管することができます。

STEP11. 電気泳動による DNA サンプルのサイズチェックと定量

精製、増幅したアダプター付き DNA ライブラリのサイズと濃度をバイオアナライザ DNA1000 アッセイもしくは 2200 TapeStation を用いて測定します。

【バイオアナライザの DNA 1000 チップと試薬キットを使う場合】

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350 μ L は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(version B.02.02 もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。
4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。以下の泳動図のように、約 225 bp-275 bp の位置にスミアなシングルピークがあることを確認します。このスミアピークの濃度をバイオアナライザのマニュアルインテグレーション機能を用いて、測定します。

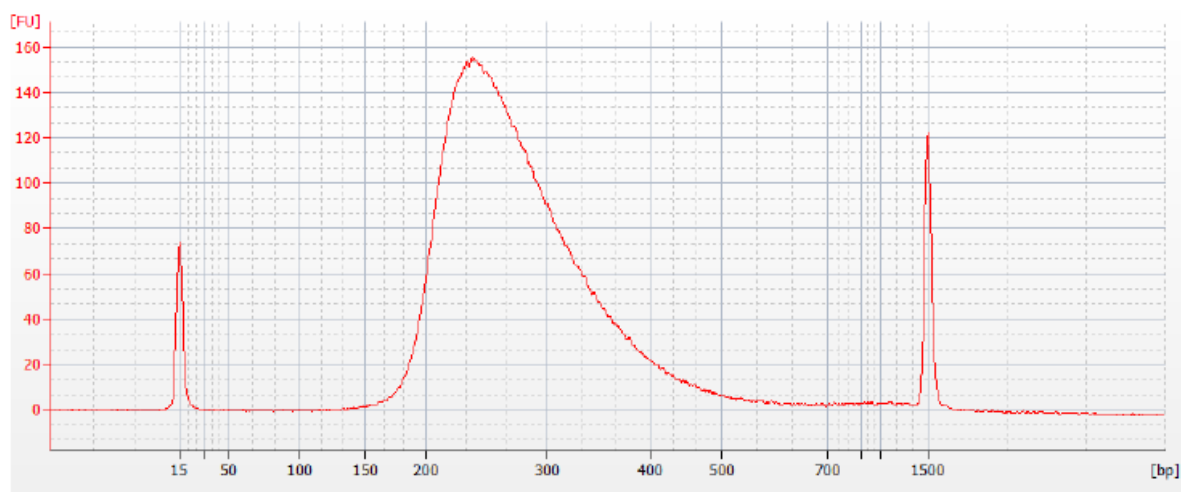


図 7 増幅されたアダプター付き DNA ライブラリの DNA1000 アッセイの泳動図。
225 bp-275 bp の位置に、シングルスミアピークのピークトップが見られます。

3. サンプルの調製 (200 ng DNA サンプル)

【4200 / 2200 TapeStation と D1000 Screen Tape を使う場合】

NOTE

バイオアナライザの代わりに D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5582) と D1000 Reagents (Agilent p/n 5067-5583) を使用する方法を選択することもできます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してください。

1. Agilent TapeStation User Manual を参照してサンプルを準備して下さい。増幅された DNA サンプルを 1 uL 取り、D1000 sample buffer 3 uL と混合します。

CAUTION

正確な定量のために、DNA と D1000 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合して下さい。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合してください。

2. Agilent TapeStation User Manual を参照して、Step1 のサンプルプレートかストリップチューブ、D1000 ScreenTape と Loading tip を TapeStation にセットします。ランを開始します。
3. 結果をチェックします。以下図の泳動図のような分布が得られ、225 bp から 275 bp 付近に DNA フラグメントの平均サイズがあることを確認します。

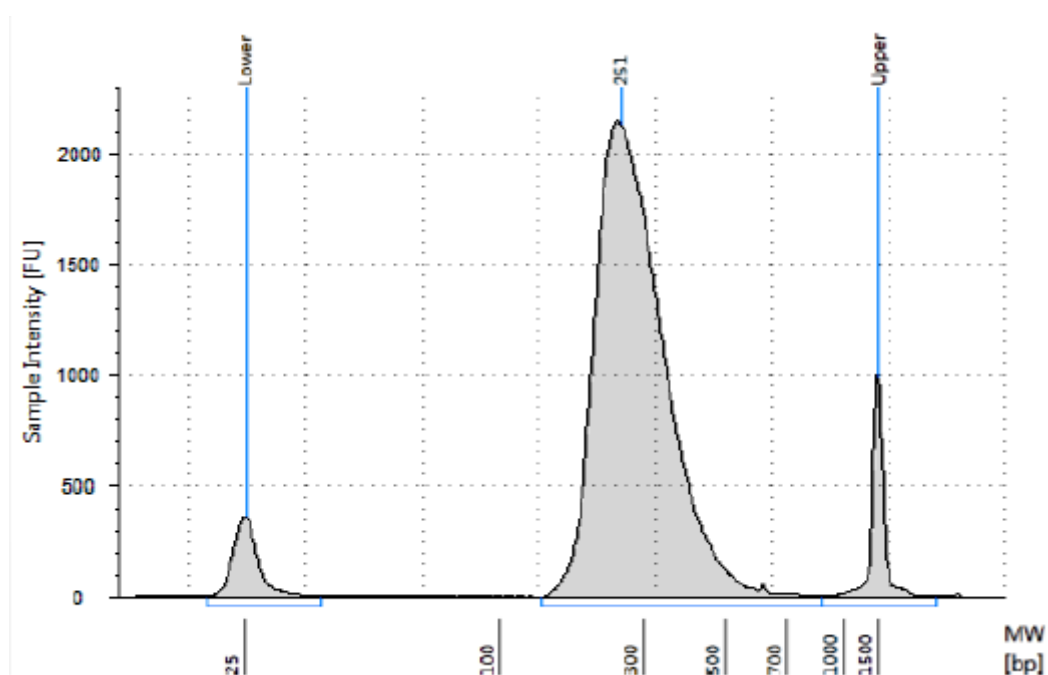


図 8 増幅したライブラリ DNA の 2200 TapeStation と D1000 ScreenTape による泳動図。225 bp-275 bp の位置に、シングルスミアピークのピークトップが見られます。

NOTE

SureSelect のハイブリダイゼーションには、750 ng のアダプター付き DNA ライブラリが必要です。また濃度は 221 ng/μL 以上である必要があります。濃度は 221 ng/μL より低い値が得られる場合が多いので、その時には濃縮遠心機を用いて、サンプルを濃縮してください。濃縮遠心を行う場合、45°C 以上の高い温度をかけないようにしてください(トミー精工社の濃縮遠心機を使用する場合は、温度は Low, 40°C で濃縮遠心します)。

ハイブリダイゼーションに用いる量が 250 ng 以下になると、シーケンスの結果に悪影響を与えます。

実際の操作については、次の章を参考にしてください。

4. ハイブリダイゼーション



4. ハイブリダイゼーション

この章では、前章で調製したイルミナ社のペアエンドアダプター付き DNA ライブラリと、アジレント社の SureSelect オリゴキャプチャライブラリをハイブリダイゼーション試薬とブロッキング試薬とともにハイブリダイズします。3 ug DNA サンプル、200 ng DNA サンプルのどちらも、ハイブリダイゼーション以降の操作ステップは同一です。

CAUTION

SureSelect オリゴキャプチャライブラリとアダプター付き DNA ライブラリの比は、高い Capture 効率を得るために極めて重要です。プロトコル記載の量に従って、ハイブリダイゼーションを行ってください。

CAUTION

Capture のためのハイブリダイゼーションは 16 時間または 24 時間行いますが、この間に 27-29 uL という少量のハイブリ溶液の蒸発を防ぐ必要があります。

実験を行う前に、必ず、実験で使用する予定のサーマルサイクラ装置 (Hot lid 付き)、Strip チューブもしくはプレート、シール方法 (Strip キャップもしくはシーリングテープ) の組み合わせで、オリゴキャプチャライブラリとアダプター付き DNA ライブラリを入れない状態で、水 27 uL をハイブリ溶液の代わりに用意し、65 °C で 24 時間 (以上)、事前テストを行ってください。必ず使用する予定のウェルポジションに、テストサンプルをセットして試験するようにしてください。(ウェルによっては、端と中央で、蒸発が異なるものがあります。)

キャップもしくはシールによる密閉を確実に行うことが重要です。

蒸発量は 3-4 uL を超えないようにしてください。(ハイブリダイゼーション後に、最低でも 20 uL の液が残ること。)

手持ちの組み合わせでのテストで、3-4 uL 以上の蒸発が見られる場合、巻末の組み合わせリストを参照して、適切な組み合わせを探してください。

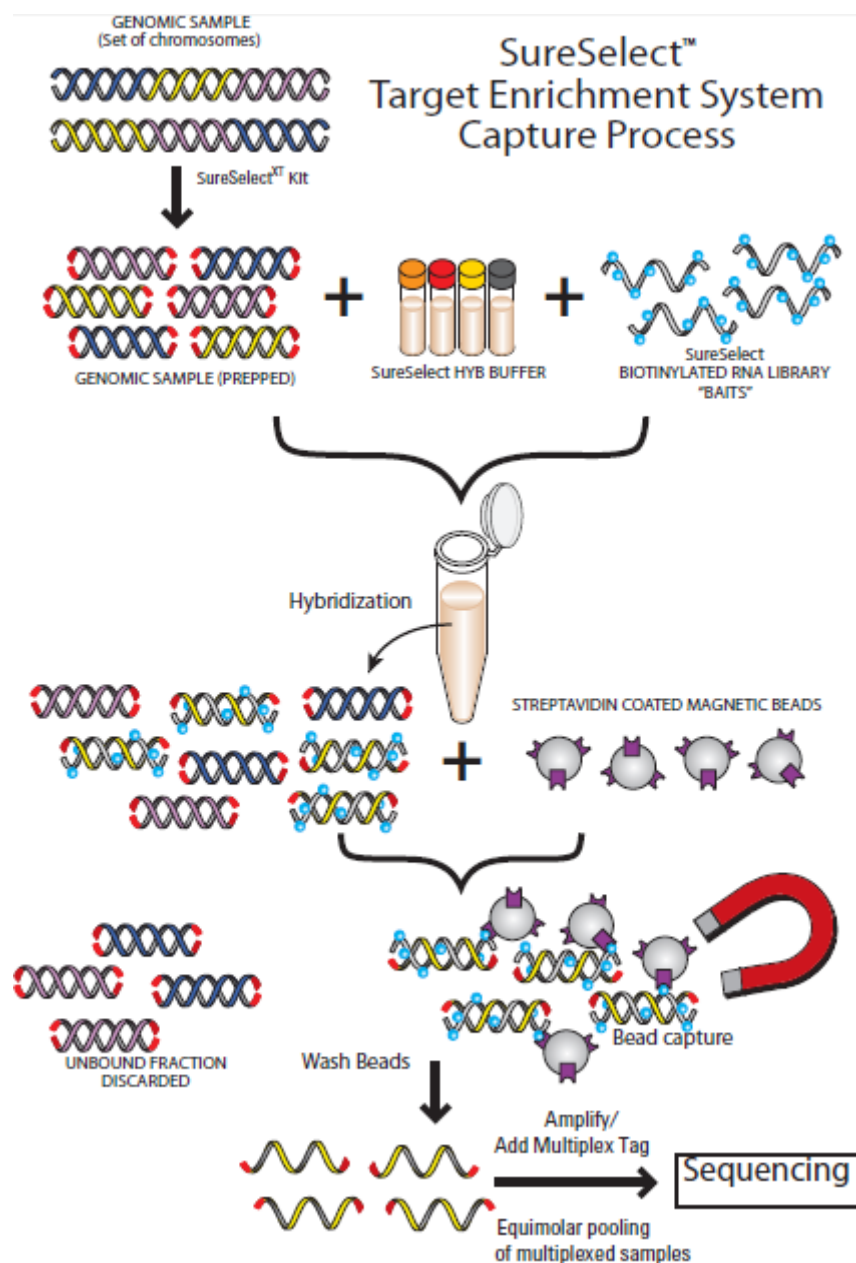


図 9 SureSelect ターゲットエンリッチメントシステムのキャプチャプロセス 概要

4. ハイブリダイゼーション

STEP1. ライブラリのハイブリダイゼーション

このステップでは、下記の表に示す試薬を使用します。

表 25 ハイブリダイゼーションに使用する試薬

Kit Component	Storage Location	Thawing Conditions
SureSelect Hyb 1	SureSelect Target Enrichment-Box 1, RT	—
SureSelect Hyb 2	SureSelect Target Enrichment-Box 1, RT	—
SureSelect Hyb 3	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box 2, -20°C	Warm to Room Temperature (RT)
SureSelect Hyb 4	SureSelect Target Enrichment-Box 1, RT	—
SureSelect Indexing Block 1	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box 2, -20°C	Thaw on ice
SureSelect Block 2	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box 2, -20°C	Thaw on ice
SureSelect ILM Indexing Block 3	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box 2, -20°C	Thaw on ice
SureSelect RNase Block	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box 2, -20°C	Thaw on ice
Capture Library	-80°C	Thaw on ice

次世代シーケンサのシーケンス量の急速な増大にともない、ターゲットシーケンスの1サンプルあたりのシーケンス量も増大しています。シーケンス量が増えると、得られたシーケンス中の Duplication Read が増える傾向があります。アジレント・テクノロジー社の典型的な結果では、Human All Exon の解析で 50 万の Raw Read が得られた場合、Duplication の割合は 5-8 %となります。200 ng スタートの場合、Duplication の割合が高めになる傾向があります。Read 数がこれより多い場合、Duplication の割合も増加していきます。Duplication Read の割合をできるだけ抑えるための対策として、SureSelect のハイブリダイゼーションでは、750 ng のアダプター付き DNA ライブラリを用いることを推奨します。濃度は 221 ng/μL 以上となります。

NOTE

FFPE 由来の gDNA サンプルをしようする場合、500 – 750 ng の範囲で使用できる最大量をハイブリダイゼーションに使用してください。FFPE サンプル向けのそのほかの改変点については 6. Appendix : FFPE 由来 DNA サンプルの使用を参照してください。

サンプルごとにハイブリダイゼーションとキャプチャを行います。この時点でサンプルのプールはしないで下さい。

1. 調製したアダプター付き DNA ライブラリの濃度は、221 ng/uL 以上の濃度である必要があります。得られた濃度が低い場合には、以下の手順で 221 ng/uL 以上になるように濃縮遠心機を用いて濃縮してください。
 - a. 前章でバイオアナライザにて濃度を測定したサンプル全量を 1.5 mL のチューブに入れます。チューブのふたには、1つ以上の穴をあけるようにしてください。またはチューブのふたを取り去り、パラフィルムでかわりにふたをして、そのパラフィルムに穴をあけておきます。
 - b. 45 °C 以下の低温で濃縮遠心機を用い、溶液を完全に蒸発させます。
 - c. 濃度が 221 ng/uL 以上になるように、適切な量の nuclease-free 水に再溶解させます。サンプルが濃縮遠心中に失われることが懸念される場合は、濃度が 221 ng/uL より濃くなるように、再溶解させます。ピペッティングによってチューブの内壁に付着したサンプルをよく再溶解させてください。
 - d. ボルテックスミキサを用いて混合し、遠心機で1分間スピンドウンします。サンプルを 8 strip tube に全量移します。

もしくは、750 ng に相当する量のライブラリ溶液を別のチューブに取り分け、3.4 uL になるまで濃縮をすることも可能です。ライブラリ溶液を完全乾固させた場合は 3.4 uL の水に再溶解し、ボルテックスミキサを用いて混合して下さい。多検体を一度に処理する場合、750 ng 分の液量は各サンプルで異なりますのでご注意下さい。

2. (オプション) 再度最終濃度を確認したい場合は、前章の最後のステップを参照し、電気泳動で最終濃度を測定します。電気泳動で最終確認した濃度に基づき、750 ng のアダプター付き DNA ライブラリが、3.4 uL の nuclease-free 水に溶解した濃度 (221 ng/uL) になるように、溶液を調製します。SureSelect オリゴキャプチャライブラリ (Bait) の量とのバランスから、アダプター付き DNA ライブラリ 750 ng の量をハイブリダイゼーションに用いることは重要なポイントです。

4. ハイブリダイゼーション

- 以下の表に従って、1.5 mL のチューブにハイブリダイゼーションバッファを室温で調製します。

表 26 ハイブリダイゼーションバッファミックス

Reagent	Volume for 1 reaction *	Volume for 16 reactions (includes excess)
SureSelect Hyb 1 (orange cap or bottle)	6.63 µL	116 µL
SureSelect Hyb 2 (red cap)	0.27 µL	4.7 µL
SureSelect Hyb 3 (yellow cap or bottle)	2.65 µL	46.4 µL
SureSelect Hyb 4 (black cap or bottle)	3.45 µL	60.4 µL
Total	13 µL	227.5

※Hyb #3 (黄キャップ) は -20℃保存品です。使用後の保存にご注意ください。

- ハイブリダイゼーションバッファミックスを 65℃で 5 分間温めてください。その後、20℃未満に冷えないように注意して保管します。ハイブリダイゼーションミックスは 20℃未満の温度では析出し、結果に著しい悪影響を与える危険性があります。65℃で 5 分間加熱した後は、25℃に設定したヒートブロック中にハイブリダイゼーションミックスを置くことを推奨します。65℃で 5 分以上置くと、バッファは蒸発してしまうので、65℃での加熱は 5 分間としてください。
- 別のチューブを準備して、以下の表を参照して SureSelect Block Mix を必要量調製します。混合した後、ピペティングでよく混合します。

表 27 SureSelect Block Mix

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
SureSelect Indexing Block 1 (green cap)	2.5 µL	42.5 µL
SureSelect Block 2 (blue cap)	2.5 µL	42.5 µL
SureSelect ILM Indexing Block 3 (brown cap)	0.6 µL	10.2 µL
Total	5.6 µL	95.2 µL

注意： 以下の各ステップでは、PCR プレートもしくは 8 strip tube の Cap Strip をステップごとに外す必要があります。再びキャップをするときには、常に新しい Cap Strip を使用することを推奨します。一度使用した Cap Strip の再利用は、サンプルの蒸発によるロスやコンタミネーション、インキュベーション中のサンプル温度が不正確になるなどのリスクがあります。ご注意ください。

6. 前項で各 750 ng の量になるように調製し、8 strip tube に入れたアダプター付き DNA ライブラリに、表 26 に従って調製した SureSelect Block Mix を 5.6 μ L ずつ加えます。ピペティングにより、よく混合します。
7. アダプター付き DNA ライブラリと SureSelect Block Mix の混合液が入った 8 Strip tube にしっかりとキャップをして、サーマルサイクラにセットし、以下のプログラムで加熱します。heat lid(ふた)の温度を 105 °C にセットするようにしてください。95 °C の加熱の後の 65 °C のインキュベーションは、次のステップでキャプチャライブラリ・ハイブリダイゼーションミックスを加えるまで、少なくとも 5 分間は行うようにします。

表 28 PCR プログラム

Step	Temperature	Time
Step 1	95°C	5 minutes
Step 2	65°C	Hold (at least 5 minutes)

CAUTION

heat lid(ふた)は熱くなるので、触れてやけどをしないように十分ご注意ください。

8. 以下の表を参照して、使用するキャプチャライブラリのターゲットサイズに応じた必要量の RNase Block 希釈液を調整します。1.5 mL のチューブで RNase Block 溶液(紫キャップ)を RNase-free 水で希釈して、必要量の RNase Block 希釈液を調製し、氷上に置きます。

表 29 RNase Block 希釈液の調製

Capture Library Size	RNase Block dilution (parts RNase Block:parts water)	Volume of dilute RNase Block Required per hybridization reaction
≥ 3.0 Mb	25% (1:3)	2 μ L
< 3.0 Mb	10% (1:9)	5 μ L

NOTE

次のステップでのハイブリダイゼーションバッファとキャプチャライブラリと RNase Block 希釈液の混合液の作製は、前項の加熱プログラムが 65 °C、5 分間のほぼ終わりに近づいた時に行うようにしてください。この混合液は、次のステップでアダプター付き DNA ライブラリと SureSelect Block Mix の混合液に加えるまで、短時間室温に置きます。SureSelect キャプチャライブラリを室温に置く時間は、できるだけ短くなるようにしてください。

4. ハイブリダイゼーション

9. 次のステップは、デザインしたキャプチャライブラリのターゲットサイズ(Mb)に応じて、参照する表が異なります。

キャプチャライブラリのターゲットサイズが 3 Mb 以上の場合は、表 30 を参照してください。

キャプチャライブラリのターゲットサイズが 3 Mb 未満の場合は、表 31 を参照してください。

適切なチューブに、ターゲットサイズに適応した表を参照して、ハイブリダイゼーションバッファミックス、RNaseBlock 希釈液、SureSelect オリゴキャプチャライブラリ(表中の SureSelect XT Capture Library)を入れます(使用前に、自分の使いたいキャプチャライブラリデザインの ID であることを確認してください。デザイン ID はチューブのラベル、またはチューブの入った箱のラベルに記載されています)。高速のボルテックスで 5 秒間攪拌し、軽くスピンドウンします。次のステップで使用するまで、この混合液は室温に置いてください。

表 30 キャプチャライブラリターゲットサイズが **3 Mb 以上** の場合の
キャプチャライブラリ・ハイブリダイゼーションミックスの作製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Hybridization Buffer mixture from step 4	13 µL	221 µL
25% RNase Block solution from step 8	2 µL	34 µL
Capture Library ≥3 Mb	5 µL	85 µL
Total	20 µL	340 µL

表 31 キャプチャライブラリターゲットサイズが **3 Mb 未満** の場合の
キャプチャライブラリ・ハイブリダイゼーションミックスの作製

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Hybridization Buffer mixture from step 4	13 µL	221 µL
10% RNase Block solution from step 8	5 µL	85 µL
Capture Library <3 Mb	2 µL	34 µL
Total	20 µL	340 µL

10. Step9 で調製したキャプチャライブラリ・ハイブリダイゼーションミックス 20 uL を、サーマルサイクラ中のアダプタ付き DNA ライブラリと Block Mix の混合液の入った 8 strip tube の各チューブに入れます。ピペッティングを 8-10 回程度行い、よく混合します。必要に応じてマルチピペットを使用してください。作業中はサーマルサイクラ中の 8 strip tube を 65 °C に保つようにして下さい。ハイブリダイゼーション反応液（アダプター付き DNA ライブラリ、ブロック試薬、ハイブリダイゼーションバッファ、SureSelect オリゴキャプチャライブラリをすべてミックスした状態）はこの時点で 27-29 uL の量となります。量はこれまでの操作中の蒸発により異なります。
11. 8 strip tube を Cap Strip で密閉します。必ず新しいキャップを使用してください。適切なキャッピングツールなどを用いて、密閉が確実に行われるようにして下さい。事前のテストで蒸発が抑えられることを確認しているキャップを用いて、8 strip tube を確実に密閉します。

CAUTION

サンプルが入ったすべてのチューブが確実に密閉されていることを確認してください。チューブとキャップの間にわずかでも隙間があると、液はハイブリ中に蒸発してしまいます。ハイブリダイゼーション中に 3 – 4 uL 以上の溶液が蒸発しないように、事前に使用するチューブ、キャップの組み合わせでテストしてください。

12. Heat lid（ふた）を 105 °C に加熱した状態で、65 °C で 16 時間もしくは 24 時間、ハイブリダイゼーションします。溶液の蒸発を防ぐために、ふたは必ず 105 °C に加熱してください。

STEP2. 磁気ビーズの調製

SureSelect Target Enrichment Kit Box #1 の以下の試薬を使用してください。

- SureSelect Binding Buffer
- SureSelect Wash 2

1. 事前に SureSelect Wash 2 を水浴中で 65 °C に加温しておきます。1 サンプルあたり 1.5 mL 使用しますので、必要量をコニカルチューブに入れて、加温します。次の STEP3 で使用します。
2. ボルテックスミキサを用いて、保存中に容器の底にたまった Dynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies、ベリタス) 磁気ビーズを十分に再懸濁します。磁気ビーズは必ず指定のものを使用してください。
3. 新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube を用意し、50 uL の Dynal 磁気ビーズを 1 サンプルあたり 1 ウェルに加えます。
4. ビーズを次の手順で洗浄します。
 - a. 200 uL の SureSelect Binding Buffer を加えます。
 - b. ビーズをピペッティングによりよく混合します。
 - c. ビーズの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube を磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで静置します。
 - d. ビーズを吸い込まないように注意しながら、上澄み液を取り除いて廃棄します。
 - e. ステップ a から d までを計3回繰り返して、ビーズを洗浄します。
5. ビーズを 200 uL の SureSelect Binding Buffer に再懸濁します。

NOTE

ストレプトアビジンビーズはエッペンドルフチューブかコニカルチューブでまとめて洗浄することができます。この洗浄には余剰分を含めた量のビーズ溶液を使用してください。洗浄したビーズを適切な量の SureSelect Binding Buffer に再懸濁したのち、キャプチャに使用する 96 ウェルプレートまたは 8 strip tube に 200 uL ずつ分注して下さい。

STEP3. SureSelect オリゴライブラリにキャプチャされた DNA の回収

SureSelect Target Enrichment Kit Box #1 の以下の試薬を使用してください。

- SureSelect Wash 1
- SureSelect Wash 2

1. 16 時間もしくは 24 時間のハイブリダイゼーション後、チューブに残っているハイブリダイゼーション溶液(アダプター付き DNA と SureSelect オリゴキャプチャライブラリの混合液)の量を、ピペットを使って測定し、記録します。複数のサンプルを同時にキャプチャしている場合は、ひとつずつ作業を行い、他のサンプルチューブは 65°C の PCR 装置に載せたままで、ビーズ溶液と混ぜるまでキャップを開けて蒸発させたり、冷やしたりしないように注意してください。この計測はできるだけ短時間に行ってください。20 uL 以下に液が減っている場合、キャプチャ性能に悪影響を与える可能性があります。また蒸発してしまっている場合は、実験をこれ以上進めることができません。再度、蒸発を最小に防ぐための組み合わせを確認ください。
2. チューブを PCR 装置で 65°C に保ちながら、ピペットで吸引して計量したハイブリダイゼーション溶液を、そのまま直接ビーズ溶液に加えます。ゆっくりピペッティングしてビーズと反応液をよく混合します。続けて次のサンプルを処理する場合は、必ずピペットチップを新しいものに交換し、目盛を 29 uL に戻すようにしてください。目視で液量が十分にあるときには、マルチピペットを用いて、液を一度にビーズ溶液のチューブに加えてもかまいません。
3. PCR プレートもしくは 8 strip tube にキャップをして、ハイブリダイゼーション溶液とビーズの入ったチューブを旋回運動するミキサーの上にセットし、室温で 30 分間インキュベーションします。ビーズがチューブ中を動いて攪拌が行われていることを確認してください。
4. インキュベーション後、軽くスピンドウンします。
5. PCR プレートもしくは 8 strip tube を磁石にセットし、溶液が透明になるまで静置します。ビーズを吸い込まないように注意して、上澄み液を取り除きます。(ビーズを吸い込むと、収量に影響します。)
6. ビーズの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、200 uL の SureSelect Wash 1 を加え、ピペッティングでよく混合して、ビーズを再懸濁させます。
7. PCR プレートもしくは 8 strip tube にキャップをして、サンプルを室温で 15 分間インキュベーションします。
8. 軽くスピンドウンします。
9. ビーズの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube を磁石にセットし、溶液が透明になるまで静置します。ビーズを吸い込まないように注意しながら上澄み液を取り除きます。

CAUTION

以降の Wash ステップで、反応液の温度を 65°C に保つことは、キャプチャの特異性を確保するために重要です。

使用する前に、SureSelect Wash Buffer 2 が 65°C に余熱されていることを確認してください。

65°C でのインキュベーションのステップに、組織培養用インキュベータのような温度振れ幅の大きい装置は使用しないでください。

10. ビーズを次の手順で洗浄します。

- a. 事前に 65 °C に加温しておいた **SureSelect Wash 2** を 200 uL をビーズの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に加え、ピペッティングでよく混合してビーズを再懸濁させます。
- b. キャップをしてサンプルの入った PCR プレートもしくは 8 strip cap を 65°C にセットしたサーマルサイクラーで 10 分間インキュベーションします。組織培養用インキュベータは温度を適切に保てないため使用しないで下さい。
- c. 軽くスピンドウンします。
- d. PCR プレートもしくは 8 strip tube を磁石にセットし、溶液が透明になるまで静置します。ビーズを吸い込まないように注意して、上澄み液を取り除きます。
- e. ステップ a から d までを計 3 回繰り返して、ビーズを洗浄します。
- f. 3 回の洗浄の後、ビーズの入った PCR プレートもしくは 8 strip tube を磁石にセットして、Wash 2 を完全に取り除きます。
- g. 30 uL の nuclease-free 水をビーズに加えてピペッティングでよく混合し、ビーズを再懸濁して下さい。次のステップに進むまで、サンプルは氷上に保管します。

NOTE

キャプチャした DNA はポストキャプチャ PCR 増幅ステップの間、ストレプトアビジンビーズに保持されています。



5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

この章では、前章で調製したキャプチャ後のライブラリを、増幅する過程で同時にインデックスバーコードタグを付けた後、精製し、定量および品質確認を行うステップを説明します。

本ステップは、**使用するインデックスの種類により、異なるプロトコル**となります。お使いになるインデックスの種類を確認の上、インデックスに対応したプロトコルをご使用ください。

8 bp の長さのインデックス使用

対応プロトコル: **STEP1A** 8bp インデックスバーコードタグを用いたキャプチャ後ライブラリの増幅

8 bp のインデックスの見分け方

16 反応用は、5500-0132 のボックス中の白色キャップのチューブに入っています。

96 反応用は、5500-0133 のボックス中の青色 96 ウェルプレート中に入っています。

6 bp の長さのインデックス使用

対応プロトコル: **STEP1B** 6bp インデックスバーコードタグを用いたキャプチャ後ライブラリの増幅

6 bp のインデックスの見分け方

16 反応用は、5500-0105 のボックス中の透明キャップのチューブに入っています。

96 反応用は、5500-0075 のボックス中の透明キャップのチューブに入っています

CAUTION

以下の STEP 1A は、8 bp の長さのインデックスバーコードを使用するためのプロトコルです。6bp の長さのインデックスバーコードを使用する場合は、STEP1B を参照してください。

8 bp のインデックスの見分け方

16 反応用は、5500-0132 のボックス中の白色キャップのチューブに入っています。

96 反応用は、5500-0133 のボックス中の青色 96 ウェルプレート中に入っています。

STEP1A. 8 bp インデックスバーコードタグ (A01-H12) を用いたキャプチャ後ライブラリの増幅

以下の表に示す試薬を使用してください。

表 32 キャプチャ後ライブラリの増幅に使用する試薬

Kit Component	Storage Location
5× Herculanse II Reaction Buffer	Herculanse II Fusion DNA Polymerase kit*, −20°C
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	Herculanse II Fusion DNA Polymerase kit*, −20°C
Herculanse II Fusion DNA Polymerase	Herculanse II Fusion DNA Polymerase kit, −20°C
SureSelect ILM Indexing Post-Capture Forward PCR Primer	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box 2, −20°C
SureSelect 8 bp Indexes (reverse primers)	SureSelect XT Library Prep Kit ILM, −20°C

*ヘラクレス(Herculanse) II Fusion DNA Polymerase に付属している試薬を必ず使用してください。他のキットの試薬を代わりに使用しないようにしてください。

CAUTION

ここに指定されている ヘラクレス(Herculanse) II Fusion DNA Polymerase 以外の酵素を使用しないでください。他の DNA Polymerase については、バリデーションされていません。

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐために、PCR 反応液の調製はラボで決められたクリーンエリアか、UV ランプを備えた PCR フード中にて陽圧の環境下で実施してください。

CAUTION

SureSelect Reagent Kit に含まれる各インデックスの塩基配列については、プロトコル巻末のリファレンスを参照してください。

1 つのキャプチャ済みライブラリに対して、1 本のチューブで増幅反応を行います。テンプレートを入れない Negative Control も準備してください。

NOTE

FFPE 由来の DNA サンプルを処理する場合、このステップの改変を行うことをおすすめします。88 ページの 表 45 全ての FFPE サンプルに適用する SureSelect XT プロトコルの改変を参照して下さい。

1. 各サンプルに割り当てる適切なインデックスを決定して記録します。
A01-H12 の 8 bp インデックスのシーケンス配列については、プロトコル巻末のリファレンスの 8 bp のインデックスの項を参照してください。同一レーンでシーケンスを行う予定のサンプルには、必ず異なるインデックス配列を割り当ててください。
2. 以下の表に従って、サンプル数に応じた反応液を氷上で作製します。表の 16 反応分の量は 1 反応分の約 1.03 倍の量で計算されています。ピペティングにより、溶液を静かに混合します。

表 33 キャプチャ後ライブラリの増幅 PCR マスターミックス (8 bp インデックス用)

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	18.5 µL	314.5 µL
5× Herculanase II Reaction Buffer (clear cap)	10 µL	170 µL
Herculanase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µL	17 µL
100 mM dNTP Mix (green cap)	0.5 µL	8.5 µL
SureSelect ILM Indexing Post-Capture Forward PCR Primer (orange cap)	1 µL	17 µL
Total	31 µL	527 µL

3. 31 µL の反応液をそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。
それぞれのサンプルについて、Agilent XT SureSelect Library Prep Kit, ILM に含まれている適切な 8 bp の Index、16 反応用は A01-H02 (白色キャップ) を、96 反応用は A01-H12 (青色 96 ウェルプレート) 各 5 µL を、それぞれのウェルもしくはチューブに入れます。同じレーンにプールするサンプルには、異なる Index primer を使用する必要があります。また 1 つのレーンに混合できるサンプル数の目安は、キャプチャのターゲットサイズによって異なります。
4. 表 36 を参照して、各サンプルレーンに適切な数のサンプルを混合するようにしてください。
5. DNA サンプルを含むビーズ溶液をインデックスに対応したそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。

5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

- a. スレプトアビジンのビーズに結合した状態の DNA サンプルが入った PCR プレートもしくは 8 strip tube を氷上から室温に移します。
 - b. ピペティングでよく混合し、ビーズが均一に懸濁されていることを確認します。この時点で、必要な DNA サンプルはまだビーズに結合した状態です。各 DNA サンプルビーズ溶液 14 uL をそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。
 - c. ピペティングにより溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。プレートもしくは 8 strip tube にキャップをします。
 - d. 残りのビーズは-20℃で保管して下さい。
6. 以下表の PCR プログラムに従って、増幅を行います。ターゲットサイズにより、必要なサイクル数が異なりますので、表 35 の推奨サイクル数を参照ください。ここで次のステップで用いる AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 34 PCR プログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	10 to 16 Cycles	98°C	30 seconds
	See 表 35 or recommendations based on Capture Library size	57°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	10 minutes
4	1	4°C	Hold

表 35 キャプチャ後ライブラリ増幅の推奨サイクル数

Capture Library	Cycles
1 kb up to 0.5 Mb	16 cycles
0.5 Mb up to 1.49 Mb	14 cycles
>1.5 Mb	12 cycles
All Exon and Exome libraries	10 to 12 cycles
OneSeq Constitutional Research Panel	10 cycles
OneSeq Hi Res CNV Backbone-based custom designs	10 cycles
OneSeq 1Mb CNV Backbone-based custom designs	10 to 12 cycles

7. PCR 増幅が終了したら、プレートまたは 8-strip tube をスピンドウンします。

78 ページの STEP2. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製に進んで下さい。

表 36 シーケンシングデータ要求ガイドライン

このガイドラインは、標準的な DNA を用いた場合、ターゲットの約 80% が 20x 以上のカバレッジで解析できることが期待されるシーケンス量です。実際のカバレッジには、多くの要素が影響します。実際のシーケンス量は、実サンプルでのカバレッジを確認の上、目的に応じて適宜再調整ください。

Capture size	Optimal sequencing output per index
Human All Exon v5	4 Gb
Human All Exon v5 + UTRs	6 Gb
Human All Exon 50 Mb	5 Gb
Human DNA Kinome	320 Mb
Mouse All Exon	5 Gb

* カスタムライブラリの場合、最初は 1 サンプルあたりキャプチャライブラリのサイズの 100-200 倍のシーケンシングデータを解析することをお勧めします。予想されるシーケンシングアウトプットに合わせてサンプルをプールしてください。

キャプチャ前の PCR 同様、キャプチャ後のサンプルの PCR 増幅のサイクル数も最小限にするようにしてください。もしくは別の確認方法として、以下の方法でテストランを行うことができます。PCR mix 溶液を各 10 uL の溶液量になるように 3 本に分けて、10, 12, 14 もしくは 16 サイクルをそれぞれ試します。この 10 uL の反応液量のサンプルを次の STEP2 で AM Pure XP ビーズで精製するにあたっては、30 uL の AMPure XP ビーズ溶液を用い、20 uL の Nuclease-free 水で溶出させます。続いて STEP3 でバイオアナライザを用いて、サイズと濃度の確認をします。サイクル数を最適化した後に、50 uL の量で再度 PCR SureSelect XT Target Enrichment System Kit for Illumina Multiplexed Sequencing

5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加を行ってください。

CAUTION

以下の STEP 1B は、6 bp の長さのインデックスバーコードを使用するためのプロトコルです。8 bp の長さのインデックスバーコードを使用する場合は、STEP1A を参照してください。

6 bp のインデックスの見分け方

16 反応用は、5500-0105 のボックス中の透明キャップのチューブに入っています。

96 反応用は、5500-0075 のボックス中の透明キャップのチューブに入っています。

STEP1B. 6 bp インデックスバーコードタグ (Index 1-16) を用いたキャプチャ後ライブラリの増幅

以下の表に示す試薬を使用してください。

表 37 キャプチャ後ライブラリの増幅に使用する試薬

Kit Component	Storage Location
5× Herculanase II Reaction Buffer	Herculanase II Fusion DNA Polymerase kit, -20°C
100 mM dNTP Mix (25 mM each dNTP)	Herculanase II Fusion DNA Polymerase kit*, -20°C
Herculanase II Fusion DNA Polymerase	Herculanase II Fusion DNA Polymerase kit, -20°C
SureSelect ILM Indexing Post-Capture Forward PCR Primer	SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box 2, -20°C
SureSelect ^{XT} Indexing reverse primers	SureSelect XT Library Prep Kit ILM, -20°C

*ヘラクレス(Herculanase) II Fusion DNA Polymerase に付属している試薬を必ず使用してください。他のキットの試薬を代わりに使用しないようにしてください。

CAUTION

ここに指定されている ヘラクレス(Herculanase) II Fusion DNA Polymerase 以外の酵素を使用しないでください。他の DNA Polymerase については、バリデーションされていません。

CAUTION

ライブラリのクロスコンタミネーションを防ぐために、PCR 反応液の調製はラボで決められたクリーンエリアか、UV ランプを備えた PCR フード中にて陽圧の環境下で実施してください。

CAUTION

SureSelect Reagent Kit に含まれる各インデックスの塩基配列については、プロトコル巻末のリファレンスを参照してください。

1 つのキャプチャ済みライブラリに対して、1 本のチューブで増幅反応を行います。テンプレートを入れない Negative Control も準備してください。

5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

NOTE

FFPE 由来の DNA サンプルを処理する場合、このステップの改変を行うことをおすすめします。88 ページの 表 45 全ての FFPE サンプルに適用する SureSelect XT プロトコルの改変を参照して下さい。

- 各サンプルに割り当てる適切なインデックスを決定して記録します。
1-16 の 6 bp インデックスのシーケンス配列については、プロトコル巻末のリファレンスの 6 bp のインデックスの項を参照してください。同一レーンでシーケンスを行う予定のサンプルには、必ず異なるインデックス配列を割り当ててください。
- 以下の表に従って、サンプル数に応じた反応液を氷上で作製します。表の 16 反応分の量は 1 反応分の約 1.03 倍の量で計算されています。ピペティングにより、溶液を静かに混合します。

表 38 キャプチャ後ライブラリの増幅 PCR マスターミックス (6 bp インデックス用)

Reagent	Volume for 1 reaction	Volume for 16 reactions (includes excess)
Nuclease-free water	22.5 µL	382.5 µL
5× Herculanase II Reaction Buffer (clear cap)	10 µL	170 µL
Herculanase II Fusion DNA Polymerase (red cap)	1 µL	17 µL
100 mM dNTP Mix (green cap)	0.5 µL	8.5 µL
SureSelect ILM Indexing Post-Capture Forward PCR Primer (orange cap)	1 µL	17 µL
Total	35 µL	595 µL

- 35 µL の反応液をそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。
それぞれのサンプルについて、Agilent XT SureSelect Library Prep Kit, ILM に含まれている適切な 6 bp の Index、1-16 (透明キャップ) 各 1 µL を、それぞれのウェルもしくはチューブに入れます。同じレーンにプールするサンプルには、異なる Index primer を使用する必要があります。また 1 つのレーンに混合できるサンプル数の目安は、キャプチャのターゲットサイズによって異なります。
- 表 36 を参照して、各サンプルレーンに適切な数のサンプルを混合するようにしてください。
- DNA サンプルを含むビーズ溶液をインデックスに対応したそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。
 - ストレプトアビジンのビーズに結合した状態の DNA サンプルが入った PCR プレートもしくは 8 strip tube を氷上から室温に移します。
 - ピペティングでよく混合し、ビーズが均一に懸濁されていることを確認します。この時

5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

点で、必要な DNA サンプルはまだビーズに結合した状態です。各 DNA サンプルビーズ溶液 14 µL をそれぞれのウェルもしくはチューブに入れます。

- c. ピペッティングにより溶液を静かに混合します。ピペットチップはサンプルごとに交換してください。プレートもしくは 8 strip tube にキャップをします。
- d. 残りのビーズは-20°Cで保管して下さい。

6. 以下の表の PCR プログラムに従って、増幅を行います。ターゲットサイズにより、必要なサイクル数が異なりますので、表 40 の推奨サイクル数を参照ください。ここで次のステップで用いる AMPure XP ビーズを必要量室温に戻しておくようにします。

表 39 PCR プログラム

Segment	Number of Cycles	Temperature	Time
1	1	98°C	2 minutes
2	10 to 16 Cycles See 表 40 for recommendations based on Capture Library size	98°C	30 seconds
		57°C	30 seconds
		72°C	1 minute
3	1	72°C	10 minutes
4	1	4°C	Hold

表 40 キャプチャ後ライブラリ増幅の推奨サイクル数

Capture Library	Cycles
1 kb up to 0.5 Mb	16 cycles
0.5 Mb up to 1.49 Mb	14 cycles
>1.5 Mb	12 cycles
All Exon and Exome libraries	10 to 12 cycles
OneSeq Constitutional Research Panel	10 cycles
OneSeq Hi Res CNV Backbone-based custom designs	10 cycles
OneSeq 1Mb CNV Backbone-based custom designs	10 to 12 cycles

キャプチャ前の PCR 同様、キャプチャ後のサンプルの PCR 増幅のサイクル数も最小限にするようにし

5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

てください。もしくは別の確認方法として、以下の方法でテストランを行うことができます。PCR mix 溶液を各 10 uL の溶液量になるように3本に分けて、10,12,14 もしくは 16 サイクルをそれぞれ試します。この 10 uL の反応液量のサンプルを次の STEP2 で AMPure XP ビーズで精製するにあたっては、30 uL の AMPure XP ビーズ溶液を用い、20 uL の Nuclease-free 水で溶出させます。続いて STEP3 でバイオアナライザを用いて、サイズと濃度の確認をします。サイクル数を最適化した後に、50 uL の量で再度 PCR を行ってください。

STEP2. Agencourt AMPure XP ビーズによるサンプルの精製

1. 使用する少なくとも 30 分以上前に、AMPure XP ビーズ (4 °C 保存、決して凍らせないようにしてください。) を室温に戻しておくようにします。サーマルサイクラを 37 °C に設定しておきます。
2. ビーズ溶液の状態や色が均一になるまで、ボルテックスミキサでよく混合します。
3. 前項の STEP1A もしくは 1B で調製した PCR 増幅後の DNA サンプル 50 uL が入った PCR プレートもしくは 8 strip tube に、均一な状態にした AMPure XP ビーズ溶液 90 uL を、注意して加えます。液を溢れさせないように注意して、ピペettingを 10 回程度行い、液をよく混合します。
4. 室温で、5 分間インキュベーションします。
5. チューブを磁石スタンドにセットします。溶液が透明になるまで待ちます。(約 3~5 分間かかります。)
6. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、ビーズを吸い込まないように注意して、透明な上澄み液を取り除き、廃棄します。
7. チューブを磁石スタンドにセットしたまま、70%エタノール溶液を各チューブに 200 uL ずつ加えます。エタノールの濃度が回収率に影響を与えるため、70%エタノールはできるだけ用時調製することを推奨します。
8. 溶液が透明になるまで、そのまま1分間静置します。その後エタノールを、ビーズを吸い込まないように注意して取り除きます。
9. 8 と 9 のステップをもう一度繰り返します。
10. チューブを磁石スタンドから外し、キャップをして軽くスピンドウンします。チューブを磁石スタンドに戻してキャップを外して 30 秒間静置した後、20 uL の容量のマイクロピペットを用いて、残ったエタノールを取り除きます。
11. サンプルチューブを 37°C のサーマルサイクラにセットして、3~5 分間 37°C で乾燥させ、残存エタノールを完全に取り除きます。乾燥は 5 分以内とし、過度の乾燥は避けるようにします。ビーズを過度に乾燥させた場合、集積したビーズにひび割れが生じて溶出効率が低下する危険性があります。
12. 30 uL の Nuclease-free 水を加え、キャップをして、ボルテックスミキサでよく攪拌します。軽くスピンドウンします。
13. 室温で 2 分間インキュベーションします。
14. チューブを磁石スタンドにセットして、溶液が透明になるまで 2~3 分間静置します。この状態で、精製された DNA は溶液のほうに移っています。

15. 上澄み液 約 30 uL を新しい PCR プレートもしくは 8 strip tube に移します。この液に精製 DNA が移っているので、液を捨てないように注意してください。ビーズはこの時点で廃棄します。

Stopping Point 次のステップにすぐに進まない場合、このサンプルは -20 °C で保管することができます。

STEP3. Agilent 2100 バイオアナライザによるキャプチャライブラリの定量とサイズ確認

精製したキャプチャライブラリの収量とサイズ分布をバイオアナライザの High Sensitivity DNA チップと試薬キットもしくは 2200 TapeStation を用いて測定します。

【バイオアナライザの High Sensitivity DNA チップと試薬キットを使う場合】

1. バイオアナライザの電極を洗浄します。正確に定量を行うため、電極クリーナーチップに入れて電極を洗浄する水 350uL は、複数回の測定を同日中に行う場合も、測定の度に交換して下さい。必要に応じて、バイオアナライザのガイドブックに従い十分な洗浄を行ってください。
2. Agilent 2100 expert ソフトウェア(**version B.02.07** もしくはそれ以上) を起動し、バイオアナライザ本体とのコミュニケーションを確認します。
3. バイオアナライザの試薬ガイドに従い、チップ、サンプル、ラダーを調製します。

CAUTION

High Sensitivity DNA キットはサンプルの塩濃度が極端に低いとベースライン不安定を引き起こすことがあります。この時点でのサンプルは水で溶出されているため、測定前にサンプル 1 uL に 1x TE を数 uL 加えて希釈することで塩を含んだ状態にし、その希釈液から 1 uL とって測定することをお勧めします。また、従来の In solution PCR 法(プロトコル ver1.4 以前)からオンビーズ PCR 法(プロトコル ver1.5 以降)に切り替えた場合、同じ PCR サイクル数で増幅しても収量が多くなる傾向があります。従来よりも高い希釈率を適用しないと、バイオアナライザの定量範囲から外れる場合がありますのでご注意ください。

希釈率は濃度の計算に重要なので、必ず記録するようにしてください。

4. 調製が終わったチップをバイオアナライザにセットします。チップ調製後、5 分以内にランをスタートさせる必要があります。
5. バイオアナライザの assay のメニューから、適切な assay を選択します。
6. ランをスタートさせます。データファイルへのリンクをクリックして、サンプル名およびコメントを書き込みます。
7. 結果をチェックします。以下の泳動図のように、約 250 bp から 350 bp の間にシングルピークのピークトップがあることを確認します。また PCR の非特異的増幅産物がないかどうか確認します。このシ

5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

シングルピークの濃度をバイオアナライザの Region table 機能を用いて、測定します。次の Step にある定量 PCR キットを用いることで、1 レーンに等量のサンプルを混合するために、さらに正確な濃度の決定を行うことができます。

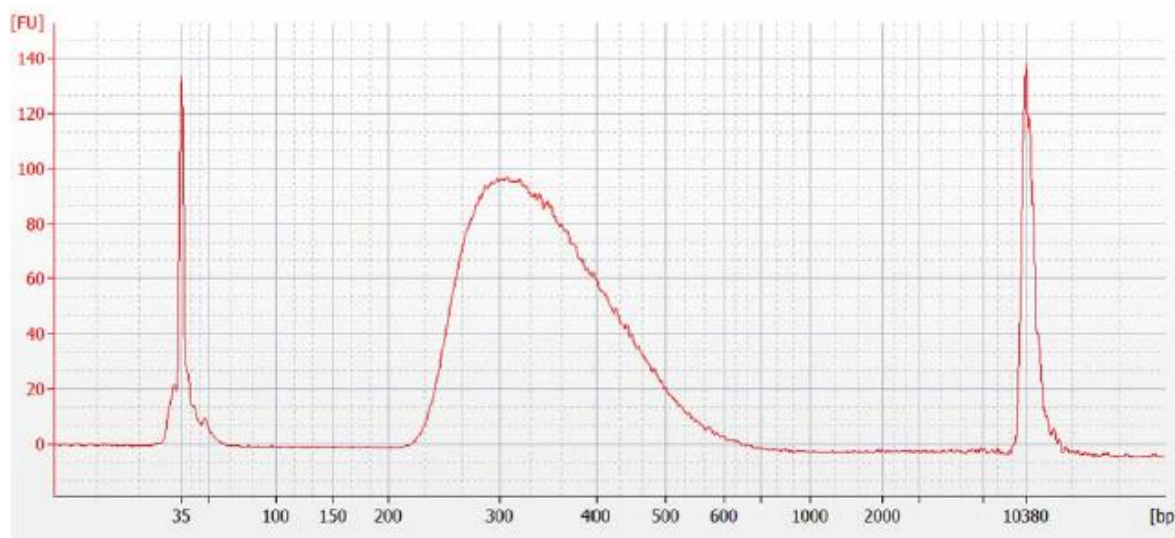


図 10 High Sensitivity DNA キットを用いたキャプチャライブラリの定量とサイズ確認
250 -350 bp の間の付近の位置にピークトップを持つスミアピークがあることを確認します。

【4200 / 2200 TapeStation と High Sensitivity D1000 Screen Tape を使う場合】

NOTE

High Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent p/n 5067-5584) と High Sensitivity D1000 Reagents (Agilent p/n 5067-5585) を使用する方法を選択することができます。詳細は Agilent 2200 TapeStation User Manual を参照してください。

1. Agilent TapeStation User Manual を参照してサンプルを準備して下さい。インデックス付加された DNA サンプルを 2 μ L 取り、High-Sensitivity D1000 sample buffer 2 μ L と混合します。

CAUTION

正確な定量のために、DNA と High Sensitivity D1000 sample buffer を混ぜたサンプルは、TapeStation 本体付属のボルテックスミキサで 2000 rpm で 1 分、混合して下さい。付属の Vortex をお持ちでない場合、Max で 10 秒の混合を 2 回繰り返して、全ウェルを確実に混合して下さい。

2. Agilent TapeStation User Manual を参照して、Step1 のサンプルプレートかストリップチューブ、High-Sensitivity D1000 ScreenTape と Loading tip を TapeStation にセットします。ランを開始します。
3. 結果をチェックします。以下図の泳動図のような分布が得られ、300 bp 付近に DNA フラグメントの

5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

平均サイズがあることを確認します。

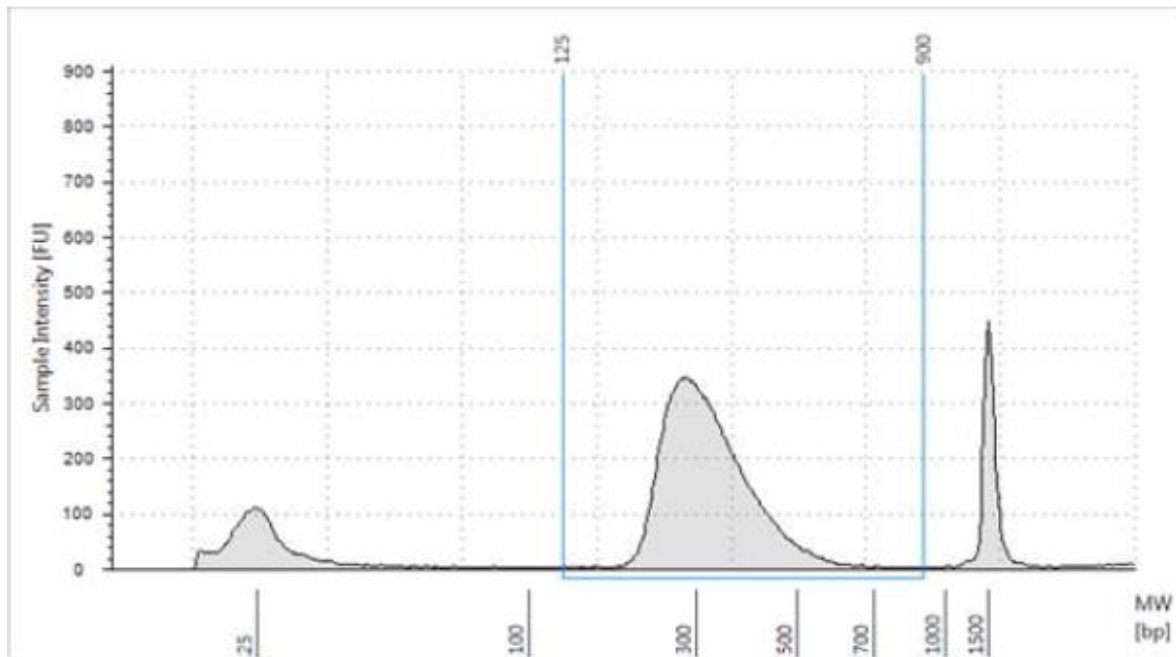


図 11 増幅したライブラリ DNA の 2200 TapeStation と High-Sensitivity D1000 ScreenTape による泳動図。250 - 350 bp 付近の位置にピークトップを持つスミアピークがあることを確認します。

STEP4. 定量 PCR によるインデックスタグ付きキャプチャライブラリの定量

以下の Step の詳細については、Agilent QPCR NGS Library Quantification Kit (p/n G4880A) のプロトコルを必ず参照ください。

1. Agilent QPCR NGS Library Quantification Kit (p/n G4880A イルミナ用) を、各インデックスタグ付きキャプチャライブラリの定量に用います。
2. G4880A のキット中の試薬を用い、プロトコルを参照して、検量線用の標準液を調製します。
3. 各インデックスタグ付きキャプチャライブラリを、検量線の濃度範囲におさまるように適切な濃度に希釈します。G4880A に含まれる指定の Dilution Buffer を使用するため、必ず G4880A のプロトコルを参照のうえ、調製ください。
一般的にはキャプチャライブラリを、およそ 1:1,000~1:10,000 の比率で希釈することになります。
4. G4880A のプロトコルを参照して、イルミナ Adapter-specific PCR Primers の入った QPCR master mix 溶液を調製します。
5. 各 PCR チューブ (プレート) に、master mix を分注し、template を加えます。
6. MX3005p などの定量 PCR システムを用いて、G4880A のプロトコルに記載されている定量 PCR のプログラムを設定して RUN します。SYBR Green 対応の機器を使用します。
7. 検量線からそれぞれのインデックスタグ付きキャプチャライブラリの濃度を計算します。濃度は nM で計算します。ここで計算された濃度を元に、マルチプレックスシーケンス用にサンプルを正確に等量でプールします。

STEP5. マルチプレックスシーケンスのためのサンプルのプール

最適なクラスタ密度はお使いのイルミナ社シーケンサの機種やVersionによって異なりますので、必ずイルミナ社の提供する最新のプロトコルをあわせて参照ください。本プロトコルに記された DNA の最終的な濃度は、イルミナ社のアップデートにより変わることがありますので、事前にご確認ください。

1. プールするサンプルは正確に等量を混ぜる必要があります。下記の式により、インデックスバーコードサンプルをプールするための量を計算します。

$$\text{Volume of Index} = \frac{V(f) \times C(f)}{\# \times C(i)}$$

V(f) : プールされたサンプルの最終的な必要量

C(f) : プールに含まれるすべての DNA の最終的な濃度

例: イルミナ標準プロトコルでは 10 nM

: プールするインデックスバーコードタグの数

C(i) : 各インデックスサンプルの初期濃度

表 41 に 4 つのインデックスタグ(それぞれ異なる初期濃度)の計算例を示します。最終的な容量(この例では 20uL、10nM の濃度)にするには Low TE を用います。

表 41 トータル量 20uL にするためのインデックスタグ付きサンプルの混合例

Component	V(f)	C(i)	C(f)	#	Volume to use (μL)
Sample 1	20 μL	20 nM	10 nM	4	2.5
Sample 2	20 μL	10 nM	10 nM	4	5
Sample 3	20 μL	17 nM	10 nM	4	2.9
Sample 4	20 μL	25 nM	10 nM	4	2
1X Low TE Buffer					7.6

2. 最終的に必要な液量になるように調製を行います。
 - ・ プールしたインデックスタグ付きサンプル量の総量が最終的に必要な液量より少ない場合、Low TE Buffer を用いて総量が最終的に必要な液量になるように調整します。
 - ・ プールしたインデックスタグ付きサンプル量の総量が最終的に必要な液量より多い場合、濃縮遠心機を用いて液を蒸発させ、再溶解して最終的に必要な液量とします。

5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

3. 調製したプールサンプルをすぐにシーケンスしない場合は、Tween20 を 0.1%(v/v)の濃度になるように加えて-20°Cで短期間保存できます。
4. template の変性とフローセルの調製に進みます。イルミナ社のプロトコルを参照してください。

ライブラリのプールのための希釈とプール方法は、フローセルのキャパシティと分析のパイプラインによって異なります。必ずイルミナ社の適切なプロトコルを参照ください。このプロトコルは 100 bp の Paired-end 用のものです。Read 長は実験の目的に合わせて適切な長さを選択してください。

STEP6. シーケンスサンプルの準備**NOTE**

FFPE 由来 DNA ライブラリのための改変を 6. Appendix に記載しています。
この改変には、アダプタートリミングについて、また、分解が進んだ DNA サンプルに
対するシーケンス量の増加についての内容が含まれます。

SureSelect XT でターゲットエンリッチメントを行ったライブラリの最適な seeding 濃度は、HiSeq およ
び MiSeq では 6 – 8 pM、NextSeq では 1.2 – 1.3 pM です。Seeding 濃度とクラスタ密度はライブラリ
DNA フラグメントのサイズ分布と得たいデータ量とクオリティによって最適化が必要です。

目的に応じて、適切な濃度でクラスタ形成を行うようにしてください。

シーケンスクオリティを向上させるための PhiX コントロールのスプライクインについては、イルミナ社の推
奨に従ってください。

イルミナ社の適切な Paired-End Cluster Generation Kit を用いて、クラスタ増幅を行ってください。

表 42 に推奨のリード長で使用可能なキットを示します。

表 42 イルミナ社シーケンス試薬の選択ガイドライン

Platform	Run Type	Read Length	SBS Kit Configuration	Chemistry
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 bp	200 Cycle Kit	v1
HiSeq 2500	Rapid Run	2 × 100 bp	200 Cycle Kit	v2
HiSeq 2500	High Output	2 × 100 bp	4 x 50 Cycle Kit	v3
HiSeq 2500	High Output	2 × 100 bp	250 Cycle Kit	v4
HiSeq 2000	All Runs	2 × 100 bp	4 x 50 Cycle Kit	v3
MiSeq	All Runs	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v2
MiSeq	All Runs	2 × 76 bp	150 Cycle Kit	v3
NextSeq 500	All Runs	2 × 100 bp	300 Cycle Kit	v1

6. リファレンス

8-bp インデックスタグ付加ライブラリのためのシーケンシングランセットアップガイドライン

8 bp インデックスを付加したライブラリは、シーケンスランは 8 bp インデックスリードを行うように設定して下さい。インデックス配列情報は 7. リファレンスを参照して下さい。

HiSeq 2500 と NextSeq 500 (v1) を使用する場合は、表 43 のサイクル数設定をして下さい。

サイクル数設定は、装置コントロールソフトウェアインターフェイスのインデックスタイプ選択ボタンから Custom を選択した後、Run Configuration スクリーンで指定できます。

表 43 HiSeq および NextSeq プラットフォームにおける Run Configuration スクリーン Cycle Number 設定

Run Segment	Cycle Number
Read 1	100
Index 1 (i7)	9
Index 2 (i5)	0
Read 2	100

MiSeq プラットフォームでは Illumina Experiment Manager (IEM) ソフトウェアを用いて、表 44 に記載のランパラメータでサンプルシートを作成します。

表 44 MiSeq プラットフォームサンプルシートのランパラメータ

Parameter	Entry
Workflow	GenerateFASTQ
Cycles for Read 1	100 for v2 chemistry 75 for v3 chemistry
Cycles for Read 2	100 for v2 chemistry 75 for v3 chemistry
Index 1 (i7) Sequence (enter in Data Section for each sample)	Type the 8-nt index sequence for each individual sample (see Table 37 on page 65).



6. Appendix : FFPE 由来 DNA サンプルの使用

FFPE 由来 DNA サンプルは、この章に記載のプロトコル改変を行うことで、Low input (200 ng DNA サンプル) プロトコルでライブラリ調製を行い、続けてターゲットエンリッチメントを行うことができます。

全ての FFPE サンプルに適用すべきプロトコル改変は 88 ページに記載されています。

FFPE サンプル DNA の分解度によっては、さらなる改変が必要になります。DNA の分解度は Agilent NGS FFPE QC キットか Agilent 4200 / 2200 TapeStation の Genomic DNA キットを用いて測定できます。

Agilent NGS FFPE QC キットは qPCR を基にして DNA の分解度を評価するためのキットです。

これにより、サンプル中の増幅可能な DNA 量正確な定量値と DNA の分解度を評価するスコアの $\Delta\Delta Cq$ 値を算出することができます。 $\Delta\Delta Cq$ に基づくプロトコル改変は 89 ページに記載しています。

Agilent 4200 / 2200 TapeStation システムと Genomic DNA キットを使用することで、ゲノム DNA の分解度の指標となる DNA Integrity Number (DIN) を算出することができます。DIN を基にしたプロトコル改変は 90 ページに記載しています。

6. リファレンス

全ての FFPE 由来 DNA サンプルに適用可能な改変

SureSelect XT プロトコルの改変

表 45 に全ての FFPE サンプルに適用するプロトコル改変を示します。

表 45 全ての FFPE サンプルに適用する SureSelect XT プロトコルの改変

Workflow Step and page	Parameter	Condition for non-FFPE Samples	Condition for FFPE Samples
Library Preparation using Low Input DNA, page 40	Duration of DNA Shearing	6 minutes	4 minutes
Library Preparation using Low Input DNA, page 48	Dilution of SureSelect Adaptor Oligo Mix for Ligation reaction	Use 1:10 dilution of SureSelect Adaptor Oligo Mix	Use undiluted SureSelect Adaptor Oligo Mix
Hybridization, page 60	Amount of prepared library added to Hybridization	750 ng	500–750 ng (use maximum available in range)
Post-capture PCR, page 70 to page 71 OR page 74 to page 75	Amount of captured DNA bead suspension added to PCR	14 µl	30 µl (decrease the amount of water added to post-capture PCR by 16 µl to compensate for greater volume of captured DNA)

シーケンスセットアップの改変

全ての FFPE サンプル由来のライブラリに対し、シーケンシングランのセットアップにアダプタートリミングを含めて下さい。

アダプタートリミングを含めるためには、IEM サンプルシートウィザードを用います。このウィザードにおいて、「**Use Adapter Trimming**」と「**Use Adapter Trimming Read 2**」を選んで下さい。これにより、MiSeq Reporter ソフトウェアはアダプター配列を認識し、リードからアダプターをトリミングします。

Agilent NGS FFPE QC キットによる測定結果を用いたプロトコル改変

ここでは、Agilent NGS FFPE QC キットを用いて算出した FFPE DNA サンプルの $\Delta\Delta Cq$ 値と、増幅可能な DNA の量を基にしたプロトコル改変について示します。Agilent NGS FFPE QC キットのプロトコルは Agilent NGS FFPE QC キットのユーザーガイド(文書番号 G9700-9000)を参照して下さい。

SureSelect XT プロトコルの改変

表 46 に FFPE サンプルに対する $\Delta\Delta Cq$ 値を基にした SureSelect XT プロトコルの改変について示します。

表 46 $\Delta\Delta Cq$ 値を基にした SureSelect XT プロトコルの改変

Protocol Step and Parameter	non-FFPE Samples	FFPE Samples		
		$\Delta\Delta Cq \leq 1^*$	$\Delta\Delta Cq$ between 1 and 4	$\Delta\Delta Cq > 4$
DNA input for Library Preparation, page 39	200 ng, based on Qubit Assay	200 ng, based on Qubit Assay	100 to 200 ng of amplifiable DNA, based on qPCR quantification	100 to 200 ng of amplifiable DNA, based on qPCR quantification
Pre-capture PCR cycle number, page 52	10 cycles	10 cycles	10 cycles	13 cycles

* $\Delta\Delta Cq$ 値が 1 以下の FFPE サンプルは、このステップでは FFPE サンプルではない場合と同じように扱います。この種類のサンプルに対しては 200 ng DNA をインプットするのに必要な液量を決定する際に、qPCR で測定した DNA 濃度ではなく、Qubit アッセイで測定した濃度を使用して下さい。

推奨シーケンス量

目的に合わせて、分解していない DNA サンプルをシーケンスする際に必要なシーケンス量を決定したのち、表 47 に記載の $\Delta\Delta Cq$ 値を基にしたガイドラインに沿って FFPE DNA サンプルに必要なシーケンス量を決定して下さい。

例えば、分解していない DNA サンプルで必要なカバレッジを得るために 100 Mb のシーケンス量が必要な場合、 $\Delta\Delta Cq$ 値が 1 の FFPE サンプルでは同じカバレッジを得るために、150 – 200 Mb のシーケンス量が必要です。

6. リファレンス

表 47 FFPE DNA サンプルに対するシーケンス量の追加についてのガイドライン($\Delta\Delta Cq$)

$\Delta\Delta Cq$ value	Recommended fold increase for FFPE-derived sample
<0.5	No extra sequencing output
between 0.5 and 2	Increase sequencing allocation by 1.5× to 2×
between 2 and 3.5	Increase sequencing allocation by 3×
between 3.5 and 5	Increase sequencing allocation by 4× to 5×
>5	Increase sequencing allocation by 6× to 10×

TapeStation の Genomic DNA キットによる測定結果を用いたプロトコル改変

ここでは、Agilent 4200 / 2200 TapeStation システムと Genomic DNA ScreenTape を用いて得られた DNA Integrity Number (DIN) 値を用いたプロトコル改変について示します。TapeStation システムを用いた DIN 値の測定については、アプリケーションノート(文書番号 G5991-5442) を参照して下さい。DIN 値を用いて、SureSelect XT プロトコルの改変やシーケンス量の追加が必要であるかどうかを決定して下さい。

SureSelect XT プロトコルの改変

表 48 に FFPE サンプルに対する DIN 値を基にした SureSelect XT プロトコルの改変について示します。

表 48 DIN 値を基にした SureSelect XT プロトコルの改変

Protocol Step and Parameter	non-FFPE Samples	FFPE Samples		
		DIN ≥ 5	DIN between 2 and 5	DIN <2
DNA input for Library Preparation, page 39	200 ng, based on Qubit Assay	200 ng, based on Qubit Assay	100 to 200 ng of amplifiable DNA, based on qPCR quantification*	100 to 200 ng of amplifiable DNA, based on qPCR quantification
Pre-capture PCR cycle number, page 52	10 cycles	10 cycles	10 cycles	13 cycles

* qPCR による定量には Agilent NGS FFPE QC キットを用いて下さい。

推奨シーケンス量

目的に合わせて、分解していない DNA サンプルをシーケンスする際に必要なシーケンス量を決定したのち、に記載の DIN 値を基にしたガイドラインに沿って FFPE DNA サンプルに必要なシーケンス量を決定して下さい。

5. ハイブリダイゼーション後の増幅とインデックスバーコードタグの付加

例えば、分解していない DNA サンプルに必要なカバレッジを得るために 100 Mb のシーケンス量が必要な場合、DIN 値が 4 の FFPE サンプルでは同じカバレッジを得るために、約 200 Mb のシーケンス量が必要です。

表 49 FFPE DNA サンプルに対するシーケンス量の追加についてのガイドライン(DIN)

DIN value	Recommended fold increase for FFPE-derived sample
≥8	No extra sequencing output
between 5 and 8	Increase sequencing allocation by 1.5×
between 3 and 5	Increase sequencing allocation by 2×
between 1.5 and 3	Increase sequencing allocation by 3× to 5×
<1.5	Increase sequencing allocation by 6× to 10×

6. リファレンス



7. リファレンス

この章では、リファレンス情報について説明します。

CAUTION

以下のリファレンスは、8 bp の長さのインデックスプライマーが入った試薬キットの情報です。6bp の長さのインデックスプライマーが入った試薬キットを使用する場合は、後述の 6bp の長さのインデックスインデックスプライマーが入った試薬キットの情報を参照してください。

8 bp のインデックスの見分け方

16 反应用は、5500-0132 のボックス中の白色キャップのチューブに入っています。

96 反应用は、5500-0133 のボックス中の青色 96 ウェルプレートに入っています。

試薬一覧 8 bp のインデックスが入った試薬キット

(白色キャップチューブもしくは青色ウェルプレートに入ったインデックスプライマーが含まれる)

SureSelect^{XT} 試薬キットは、室温保存品、-20℃保存品、-80℃保存品が、それぞれ異なる Box に入り、ラベルに保管温度が記載されています。必ず指定温度で保管してください。

また、これらの試薬キットは、各種 SureSelect キットの種類により試薬の組成が異なります。必ずそのキットに添付されてきた試薬キットを実験に使うように注意ください。必ず使用前に下の表に記載された各試薬キットの部品番号が、使用する予定の試薬ボックスのラベルに記載されている番号と一致することを確認してください。

表 50 SureSelect^{XT} キット (8 bp インデックス対応) 構成試薬一覧

Product	Storage Condition	16 Reactions	96 Reactions	480 Reactions
SureSelect XT Library Prep Kit ILM	-20°C	5500-0132	5500-0133	5 x 5500-0133
SureSelect Target Enrichment-Box 1	Room Temperature	5190-8645	5190-8646	5 x 5190-8646
SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box 2	-20°C	5190-4455	5190-4456	5190-4457

次に、各キットの内容について以下の表に示します。

6. リファレンス

表 51 SureSelect XT Library Prep Kit ILM (8 bp インデックス対応) (-20°C保存)内訳

Kit Component	16 Reactions	96 or 480 Reactions
10X End Repair Buffer	tube with clear cap	tube with clear cap
10X Klenow Polymerase Buffer	tube with blue cap	tube with blue cap
5X T4 DNA Ligase Buffer	tube with green cap	tube with green cap
T4 DNA Ligase	tube with red cap	tube with red cap
Exo(-) Klenow	tube with red cap	tube with red cap
T4 DNA Polymerase	tube with purple cap	tube with purple cap
Klenow DNA Polymerase	tube with yellow cap	tube with yellow cap
T4 Polynucleotide Kinase	tube with orange cap	tube with orange cap
dATP	tube with green cap	tube with green cap
dNTP Mix	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect Adaptor Oligo Mix	tube with brown cap	tube with brown cap
SureSelect Primer (forward primer)	tube with brown cap	tube with brown cap
SureSelect ^{XT} 8 bp Index reverse primers [*]	SureSelect 8bp Indexes A01 through H02, provided in 16 white-capped tubes	SureSelect 8bp Indexes A01 through H12, provided in blue 96-well plate [†]

*インデックスシーケンスについては、表 55 を参照ください。

†プレートマップについては、表 54 を参照ください。

表 52 SureSelect Target Enrichment Kit Box #1(室温保存)内訳

Kit Component	16 Reactions	96 or 480 Reactions
SureSelect Hyb 1	tube with orange cap	tube with orange cap
SureSelect Hyb 2	tube with red cap	tube with red cap
SureSelect Hyb 4	tube with black cap	tube with black cap
SureSelect Binding Buffer	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 1	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 2	bottle	bottle

表 53 SureSelectTarget Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box #2 (-20°C保存)内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions	480 Reactions
SureSelect Hyb 3	tube with yellow cap	tube with yellow cap	bottle
SureSelect Indexing Block 1	tube with green cap	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect Block 2	tube with blue cap	tube with blue cap	tube with blue cap
SureSelect ILM Indexing Block 3	tube with brown cap	tube with brown cap	tube with brown cap
SureSelect RNase Block	tube with purple cap	tube with purple cap	tube with purple cap
SureSelect ILM Indexing Pre-Capture PCR Reverse Primer	tube with clear cap	tube with clear cap	tube with clear cap
SureSelect ILM Indexing Post-Capture Forward PCR Primer	tube with orange cap	tube with orange cap	tube with orange cap

表 54 SureSelect XT Library Prep Kit 5500-0133 に含まれている青色 96 ウェルプレートの
8 bp インデックス A01-H12 までのマップ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A01	A02	A03	A04	A05	A06	A07	A08	A09	A10	A11	A12
B	B01	B02	B03	B04	B05	B06	B07	B08	B09	B10	B11	B12
C	C01	C02	C03	C04	C05	C06	C07	C08	C09	C10	C11	C12
D	D01	D02	D03	D04	D05	D06	D07	D08	D09	D10	D11	D12
E	E01	E02	E03	E04	E05	E06	E07	E08	E09	E10	E11	E12
F	F01	F02	F03	F04	F05	F06	F07	F08	F09	F10	F11	F12
G	G01	G02	G03	G04	G05	G06	G07	G08	G09	G10	G11	G12
H	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H09	H10	H11	H12

6. リファレンス

表 55 8 bp インデックスの配列情報 (16 反応は白色キャップのチューブ A01-H02、
96 反応は青色プレート A01-H12)

Index	Sequence	Index	Sequence	Index	Sequence	Index	Sequence
A01	ATGCCTAA	A04	AACTCACC	A07	ACGTATCA	A10	AATGTTGC
B01	GAATCTGA	B04	GCTAACGA	B07	GTCTGTCA	B10	TGAAGAGA
C01	AACGTGAT	C04	CAGATCTG	C07	CTAAGGTC	C10	AGATCGCA
D01	CACTTCGA	D04	ATCCTGTA	D07	CGACACAC	D10	AAGAGATC
E01	GCCAAGAC	E04	CTGTAGCC	E07	CCGTGAGA	E10	CAACCACA
F01	GACTAGTA	F04	GCTCGGTA	F07	GTGTTCTA	F10	TGGAACAA
G01	ATTGGCTC	G04	ACACGACC	G07	CAATGGAA	G10	CCTCTATC
H01	GATGAATC	H04	AGTCACTA	H07	AGCACCTC	H10	ACAGATTC
A02	AGCAGGAA	A05	AACGCTTA	A08	CAGCGTTA	A11	CCAGTTCA
B02	GAGCTGAA	B05	GGAGAACA	B08	TAGGATGA	B11	TGGCTTCA
C02	AAACATCG	C05	CATCAAGT	C08	AGTGGTCA	C11	CGACTGGA
D02	GAGTTAGC	D05	AAGGTACA	D08	ACAGCAGA	D11	CAAGACTA
E02	CGAACTTA	E05	CGCTGATC	E08	CATACCAA	E11	CCTCCTGA
F02	GATAGACA	F05	GGTGCGAA	F08	TATCAGCA	F11	TGGTGGTA
G02	AAGGACAC	G05	CCTAATCC	G08	ATAGCGAC	G11	AACAACCA
H02	GACAGTGC	H05	CTGAGCCA	H08	ACGCTCGA	H11	AATCCGTC
A03	ATCATTCC	A06	AGCCATGC	A09	CTCAATGA	A12	CAAGGAGC
B03	GCCACATA	B06	GTACGCAA	B09	TCCGTCTA	B12	TTCACGCA
C03	ACCACTGT	C06	AGTACAAG	C09	AGGCTAAC	C12	CACCTTAC
D03	CTGGCATA	D06	ACATTGGC	D09	CCATCCTC	D12	AAGACGGA
E03	ACCTCCAA	E06	ATTGAGGA	E09	AGATGTAC	E12	ACACAGAA
F03	GCGAGTAA	F06	GTCGTAGA	F09	TCTTCACA	F12	GAACAGGC
G03	ACTATGCA	G06	AGAGTCAA	G09	CCGAAGTA	G12	AACCGAGA
H03	CGGATTGC	H06	CCGACAAC	H09	CGCATACA	H12	ACAAGCTA

CAUTION

以下のリファレンスは、6 bp の長さのインデックスプライマーが入った試薬キットの情報です。8 bp の長さのインデックスプライマーが入った試薬キットを使用する場合は、前項の 8 bp の長さのインデックスインデックスプライマーが入った試薬キットの情報を参照してください。

6 bp のインデックスの見分け方

16 反应用は、5500-0105 のボックス中の透明キャップのチューブに入っています。

96 反应用は、5500-0075 のボックス中の透明キャップのチューブに入っています。

試薬一覧 6 bp のインデックスが入った試薬キット

(透明キャップチューブに入った 1-16 までのインデックスプライマーが含まれる)

SureSelect^{XT} 試薬キットは、室温保存品、-20℃保存品、-80℃保存品が、それぞれ異なる Box に入り、ラベルに保管温度が記載されています。必ず指定温度で保管してください。

また、これらの試薬キットは、各種 SureSelect キットの種類により試薬の組成が異なります。必ずそのキットに添付されてきた試薬キットを実験に使うように注意ください。必ず使用前に下の表に記載された各試薬キットの部品番号が、使用する予定の試薬ボックスのラベルに記載されている番号と一致することを確認してください。

表 56 SureSelect^{XT} キット (6 bp インデックス対応) 構成試薬一覧

Product	Storage Condition	16 Reactions	96 Reactions	480 Reactions
SureSelect XT Library Prep Kit ILM	-20°C	5500-0105	5500-0075	5 x 5500-0075
SureSelect Target Enrichment-Box 1	Room Temperature	5190-4393	5190-4394	5190-4395
SureSelect Target Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box 2	-20°C	5190-4455	5190-4456	5190-4457

次に、各キットの内容について以下の表に示します。

6. リファレンス

表 57 SureSelect XT Library Prep Kit ILM (6 bp インデックス対応) (-20℃保存)内訳

Kit Component	Format
10X End Repair Buffer	tube with clear cap
10X Klenow Polymerase Buffer	tube with blue cap
5X T4 DNA Ligase Buffer	tube with green cap
T4 DNA Ligase	tube with red cap
Exo(-) Klenow	tube with red cap
T4 DNA Polymerase	tube with purple cap
Klenow DNA Polymerase	tube with yellow cap
T4 Polynucleotide Kinase	tube with orange cap
dATP	tube with green cap
dNTP Mix	tube with green cap
SureSelect Adaptor Oligo Mix	tube with brown cap
SureSelect Primer (forward primer)	tube with brown cap
PCR Primer Index 1 through Index 16 (reverse primers containing 6-bp index sequences)*	16 tubes with clear caps

*インデックスシーケンスについては、表 60 を参照ください。

表 58 SureSelect Target Enrichment Kit Box #1(室温保存)内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions	480 Reactions
SureSelect Hyb 1	tube with orange cap	tube with orange cap	bottle
SureSelect Hyb 2	tube with red cap	tube with red cap	tube with red cap
SureSelect Hyb 4	tube with black cap	tube with black cap	bottle
SureSelect Binding Buffer	bottle	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 1	bottle	bottle	bottle
SureSelect Wash Buffer 2	bottle	bottle	bottle
SureSelect Elution Buffer*	tube with blue cap	bottle	bottle
SureSelect Neutralization Buffer*	bottle	bottle	bottle

*Elution Buffer と Neutralization Buffer は、本プロトコル中では使用しません。

表 59 SureSelectTarget Enrichment Kit ILM Indexing Hyb Module Box #2 (-20℃保存)内訳

Kit Component	16 Reactions	96 Reactions	480 Reactions
SureSelect Hyb 3	tube with yellow cap	tube with yellow cap	bottle
SureSelect Indexing Block 1	tube with green cap	tube with green cap	tube with green cap
SureSelect Block 2	tube with blue cap	tube with blue cap	tube with blue cap
SureSelect ILM Indexing Block 3	tube with brown cap	tube with brown cap	tube with brown cap
SureSelect RNase Block	tube with purple cap	tube with purple cap	tube with purple cap
SureSelect ILM Indexing Pre-Capture PCR Reverse Primer	tube with clear cap	tube with clear cap	tube with clear cap
SureSelect ILM Indexing Post-Capture Forward PCR Primer	tube with orange cap	tube with orange cap	tube with orange cap

表 60 6 bp インデックスの配列情報 (16、96 反応キットともに透明キャップのチューブ)

Index Number	Sequence
1	ATCACG
2	CGATGT
3	TTAGGC
4	TGACCA
5	ACAGTG
6	GCCAAT
7	CAGATC
8	ACTTGA
9	GATCAG
10	TAGCTT
11	GGCTAC
12	CTTGTA
13	AAACAT
14	CAAAAG
15	GAAACC
16	AAAGCA

※Index Number 13 から index Number 16 までのバーコードは、塩基配列とバーコード番号の割り当てが Illumina 社の提供しているインデックスの割り当てと異なりますのでご注意ください。

6. リファレンス

キャプチャハイブリダイゼーションに使用する機器とチューブ類の組み合わせについて

SureSelect のハイブリダイゼーションでは、27-29 uL という少量の溶液を 16 時間(以上)にわたってハイブリダイゼーションするため、蒸発を防ぐことが大切です。必ず、使用を予定している手持ちのサーマルサイクラ、ウェルプレート、チューブ、キャップ、シールで事前にテストを行ってください。(p.58 参照)

下記の表 61 は、これまでにアジレント社で確認している、蒸発を抑えられる組み合わせになります。これらの組み合わせで用いる場合であっても、必ず事前にテストをしてからハイブリダイゼーションに用いください。またキャップの密閉がゆるいと、この組み合わせであっても液が蒸発してしまうので、セットするときには念入りに注意してください。

表 61 蒸発を抑えられることが過去に確認された組み合わせ

PCR Machine	Plate/Strips	Cover	Comments
Agilent Mx3005P QPCR	Mx3000P Strip Tubes (401428)	MX3000P Optical Strip Caps (401425)	Heated Lid
Agilent Mx3005P QPCR	MicroAmp Optical 96-well reaction plate (N801-0560)	MicroAmp Clear Adhesive Film (4306311)	Heated Lid; ABI compression pad (4312639) Use two layers of film.
ABI GeneAmp 9700	MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (N801-0560)	MicroAmp Caps (8caps/strip) (N801-0535)	Heated Lid
ABI Veriti (4375786)	MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (N801-0560)	MicroAmp Clear Adhesive Film (4306311)	Heated Lid; ABI compression pad (4312639) Use two layers of film.
Eppendorf Mastercycler	Eppendorf 8-Tube PCR Tubes	Attached lids	Lid heating set to 75°C
BioRad (MJ Research) PTC-200	Agilent strip tubes 410022 (Mx4000)	Agilent Optical cap 410024 (Mx4000)	Heated Lid
BioRad (MJ Research) PTC-200	Agilent strip tubes 410022 (Mx4000)	Agilent Optical cap 401425 (Mx3000/3005)	Heated Lid
BioRad (MJ Research) PTC-200	Agilent 96-well Plate 410088 (Mx3000/3005)	Agilent Optical cap 401425 (Mx3000/3005)	Heated Lid

すべての権利は留保されています。著作権法で認められている場合を除き、本書を許可なく複製、改作、翻訳することは禁止されています。

本和文プロトコルの著作権は全て Agilent Technologies, Inc.が所有しています。

ご注意

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

本書は、内容について細心の注意をもって作成いたしましたが、万一ご不審な点や誤り、記載もれ等、お気づきの点がございましたら当社までお知らせください。

当社では、下記の項目を補償の対象から除外いたします。

ユーザの誤った操作に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

本キットの本来の用途以外の使用に起因する機器などの損傷、性能上のトラブル、損害

本プロトコルに以外の方法または試薬を用いたことによる性能上のトラブル、損害。

分析結果に基づく損失

本書の内容の一部または全部を無断で複製、転載したり、他の言語に翻訳することは法律で禁止されています。複製、転載などの必要が生じた場合は、当社にお問い合わせください。

本製品パッケージとして提供した本マニュアル、CD-ROM 等の媒体は本製品用にだけお使いください。

保証

本書に記載した内容は、予告なしに変更することがあります。

Agilent Technologies は、本品に関していかなる保証も行いません。これには暗黙の保証、または商品性および特定目的への適合性が含まれますが、それらに限定されません。

Agilent Technologies は、本書に含まれている誤植、あるいは本品の性能、または使用に関する偶発的ないし間接的な損害に関して責任を負いません。

SureSelectに関するサポートお問い合わせ窓口

Tel : 0120-477-111

E-mail : email_japan@agilent.com

* SureSelectのテクニカルな質問と明示ください。

* 価格、納期等のご質問は担当営業にご連絡ください。